

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIÓLOGICAS

Departamento de Genética



**CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA Y GENÉTICA
DE LAS POBLACIONES ESPAÑOLAS DE CANGREJO DE
RÍO AUSTROPOTAMOBIVUS PALLIPES
(LEREBoullet, 1858) MEDIANTE EL USO DE
MARCADORES MOLECULARES**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR**

Beatriz Beroiz Remírez

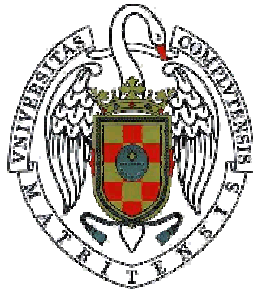
Bajo la dirección del Doctor:

María Dolores Ochando González

Madrid, 2004

ISBN:84-669-2467-1

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



**CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA Y GENÉTICA DE LAS
POBLACIONES ESPAÑOLAS DE CANGREJO DE RÍO
Austropotamobius pallipes (Lereboullet, 1858) MEDIANTE EL
USO DE MARCADORES MOLECULARES**

TESIS DOCTORAL

BEATRIZ BEROIZ REMÍREZ

MADRID, 2004

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA Y GENÉTICA DE LAS
POBLACIONES ESPAÑOLAS DE CANGREJO DE RÍO
Austropotamobius pallipes (Lereboullet, 1858) MEDIANTE EL USO DE
MARCADORES MOLECULARES**

**Memoria que para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por
la Universidad Complutense de Madrid presenta**

Beatriz Beroiz Remírez

Directora:

Dra. M^a Dolores Ochando González

Codirectora:

Dra. M^a Carmen Callejas Hervás

MADRID, 2004

A Iñigo

A mis padres

Agradecimientos

Y por fin, lo último por escribir y lo más difícil. Quisiera con estas pocas palabras agradecer a todas las personas que me han ayudado a llevar a cabo este trabajo.

Al Prof. Juan Ramón Lacadena, Director del Departamento de Genética, donde se ha realizado la mayor parte de esta Tesis Doctoral.

A la Consejería de Agricultura y Medio Ambiente de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, porque la concesión de la beca predoctoral sobre “Astacicultura” ha permitido realizar este trabajo. Y a D. Joaquín Ortiz, Director del Centro de Investigación Agraria y Ambiental de Albaladejito, donde se realizó parte de esta Tesis Doctoral.

A la Dra. M^a Dolores Ochando, mi directora de Tesis, por confiar en mí, por su ayuda y, especialmente, por el esfuerzo que ha realizado en estos últimos meses.

A la Dra. Carmen Callejas, co-directora de esta Tesis, por acceder a participar en la dirección de este trabajo y su valiosa dedicación.

A Fernando Alonso, que aunque oficialmente no figure en la dirección de esta Tesis, ha sido una pieza clave y sin él no habría trabajo que defender.

A todas las personas que han colaborado en la obtención de las muestras, enviándolas y participando en los muestreos: Mari Cruz y Fernando Alonso (en la obtención de las poblaciones de Castilla-La Mancha), Consuelo Temiño (en las de Burgos), Javier Diéguez-Uribeondo y José Luis Múzquiz (en la de Navarra), José M. Gil (en la de Granada), Enrique Castián (en la del País Vasco), Emili Bassol (en la de Gerona), Tomás Sanz (en la de León) y Frédéric Grandjean (en la muestra de Italia).

A Pedro Cuesta, del Centro de Proceso de Datos de la Universidad Complutense de Madrid, por su ayuda en el tratamiento y análisis de los datos estadísticos, y por su paciencia.

A Susana Ramírez por su ayuda en la elaboración de la cartografía.

A Mari Carmen, porque siempre ha tenido todo a punto.

A los profesores del Departamento que siempre han estado ahí, en especial a Nieves, Conchita por escucharme y animarme en todo momento, y a Charo, que “siempre” está.

A los compañeros del Centro de Investigación Agraria y Ambiental de Albaladejito, especialmente a Rocío, Mari Cruz, Orencio, Ramón y Guillermo, porque con ellos he compartido poco tiempo pero inolvidable.

A todos mis compañeros del Departamento, por ser tan “majos” y porque he pasado con ellos unos años imborrables. A todos, Eduardo, Nacho, Silvia, Salva, Aitor, Mónica, Belén, Esther, a los fichajes de última hora Vicky y Mónica (qué fuerte)... A Manolo e Isa porque han estado siempre que les he necesitado.

A mis compañeras de grupo, Carmen, Paz y Lola, por compartir el trabajo, las risas, los despistes y los placeres gastronómicos, que espero continúen.

A los compañeros del 202 y 201 del Centro de Investigaciones Biológicas, por preguntarme todos los días “qué tal la tesis”, especialmente a Félix Ortego por darme tantas facilidades y a Cristina Caballero porque la hora del desayuno ha sido uno de los mejores momentos del día.

De todos ellos, quiero hacer un agradecimiento, posiblemente el más especial, a la persona que me ha enseñado todo desde que entré en el Departamento, por ser tan buena maestra y, sobretodo, amiga. Sólo puedo decirte, muchas gracias Carmen (y cómo no, tú más y, por supuesto, perdón).

A los amigos de fuera por aguantarme todos estos años (y lo que os queda), en especial a Mari Luz, Mai, Alfredo y Susana. Y a la Asociación Amaranta por echarme una mano cuando más lo necesitaba.

A mi familia. A Javier, María y especialmente a Diana que siempre ha confiado en mí y me ha animado. A mis padres, por darme esta oportunidad, por su preocupación y constantes ánimos. Desde luego, esta Tesis es tanto vuestra como mía. Y a Iñigo, por la cantidad de tiempo que ha invertido en este trabajo, porque siempre ha estado dispuesto a echarme una mano, por estar siempre a mi lado y, sobretodo, por hacerme siempre sonreír.

Índice de Contenidos

1	INTRODUCCIÓN	2
1.1	TAXONOMÍA, DISTRIBUCIÓN Y ECOLOGÍA DEL CANGREJO DE RÍO	2
1.2	SITUACIÓN ACTUAL DE LAS POBLACIONES DE CANGREJO AUTÓCTONO	8
1.3	LEGISLACIÓN	14
1.4	ESTUDIOS GENÉTICOS Y MORFOMÉTRICOS	19
1.5	OBJETIVOS	28
2	MATERIAL Y MÉTODOS	31
2.1	MATERIAL	31
2.1.1	Captura de los individuos de <i>Austropotamobius pallipes</i>	38
2.1.2	Transporte, conservación y mantenimiento de los animales	41
2.1.3	Material para el análisis genético	42
2.1.4	Material para el análisis morfométrico	43
2.2	MÉTODOS	44
2.2.1	Extracción de ADN	44
2.2.2	Amplificación de ADN mediante RAPD-PCR	46
2.2.3	Metodología del análisis morfométrico	49
2.3	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
2.3.1	Análisis estadístico de RAPD	51
2.3.1.1	Polimorfismo	52
2.3.1.2	Análisis de Ji-cuadrado	52
2.3.1.3	Índice de diversidad	53
2.3.1.4	Índice de similitud	53
2.3.1.5	Distancias genéticas	54
2.3.1.6	Cálculo de F_{ST} y Nm	55
2.3.1.7	Análisis de la varianza molecular (AMOVA)	56
2.3.1.8	Test de Mantel	57
2.3.1.9	Análisis de componentes principales	58
2.3.1.10	Construcción de dendrogramas	60
2.3.2	Análisis estadístico de datos morfométricos	61

2.3.2.1	Análisis descriptivo	61
2.3.2.2	Estudio descriptivo de normalidad.....	62
2.3.2.3	Transformación logarítmica de los datos	62
2.3.2.4	Test <i>t</i> de Student.....	63
2.3.2.5	Prueba de Mann-Whitney	63
2.3.2.6	Análisis MLG univariante	64
2.3.2.7	Análisis de Componentes Principales.....	65
3	RESULTADOS	68
3.1	ESTRUCTURA GENÉTICO-POBLACIONAL DE LA ESPECIE <i>AUSTROPOTAMOBIVUS PALLIPES</i>	68
3.1.1	Frecuencias.....	68
3.1.2	Polimorfismo	83
3.1.3	Análisis de Ji-cuadrado	86
3.1.4	Índice de diversidad	96
3.1.5	Índice de similitud	99
3.1.6	Distancias genéticas.....	101
3.1.7	F_{ST} y Nm	103
3.1.8	Análisis de la varianza molecular (AMOVA).....	104
3.1.9	Test de Mantel	106
3.1.10	Análisis de componentes principales.....	107
3.1.11	Construcción de dendrogramas.....	115
3.2	ESTRUCTURA MORFOMÉTRICO-POBLACIONAL DE LA ESPECIE <i>AUSTROPOTAMOBIVUS PALLIPES</i>	123
3.2.1	Análisis descriptivo	123
3.2.2	Estudio descriptivo de normalidad.....	127
3.2.3	Transformación logarítmica de los datos	128
3.2.4	Test <i>t</i> de Student y prueba de Mann-Whitney	128
3.2.5	Análisis MLG univariante	129
3.2.6	Análisis de Componentes Principales.....	140
3.2.6.1	Análisis de componentes principales de las hembras	147
3.2.6.2	Análisis de componentes principales de los machos.....	154

4 DISCUSIÓN	162
4.1 IDENTIFICACIÓN	163
4.2 CANTIDAD DE VARIABILIDAD GENÉTICA	165
4.3 PATRONES DE DISTRIBUCIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA	172
4.4 RELACIONES FILOGENÉTICAS	176
4.5 VARIABILIDAD MORFOMÉTRICA	181
4.6 GENÉTICA Y MORFOMETRÍA	188
5 CONCLUSIONES	196
6 RESUMEN	199
7 BIBLIOGRAFÍA	203
ANEXOS	222
ANEXO 1. ABREVIATURAS GENERALES	222
ANEXO 2. ABREVIATURAS DE LAS POBLACIONES ANALIZADAS DE <i>AUSTROPOTAMOBIVS PALLIPES</i>	223
ANEXO 3. ABREVIATURAS DE LAS MEDIDAS MORFOMÉTRICAS	224
ANEXO 4. MATRIZ DE CORRELACIONES DE LAS ONCE POBLACIONES DE <i>A.</i> <i>PALLIPES</i> ANALIZADAS	225
ANEXO 5. MATRIZ DE CORRELACIONES DE LAS DOCE POBLACIONES DE <i>A.</i> <i>PALLIPES</i> ANALIZADAS	226
ANEXO 6. CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA DE CADA UNA DE LAS POBLACIONES ESPAÑOLAS DE <i>AUSTROPOTAMOBIVS PALLIPES</i> ANALIZADAS	227

Índice de tablas

Tabla 1. Taxonomía de la Familia Astacidae.....	3
Tabla 2. Legislación autonómica y nacional relativa a la conservación del cangrejo autóctono <i>Austropotamobius pallipes</i>	18
Tabla 3. Poblaciones analizadas.	35
Tabla 4. Número total de individuos utilizados en el análisis genético de las doce poblaciones, españolas e italiana, de <i>A. pallipes</i> , y sexo de los mismos.	42
Tabla 5. Número y porcentaje de machos y hembras en las once poblaciones de <i>A. pallipes</i> utilizados en el análisis morfométrico.	43
Tabla 6. Secuencia de los oligodecámeros de las series A y C (Operon Technologies, Inc.) utilizados en la amplificación del ADN de <i>A. pallipes</i> mediante RAPD-PCR.	47
Tabla 7. Medidas morfométricas analizadas en los individuos de <i>A. pallipes</i> estudiados.	49
Tabla 8. Diseño del análisis de la varianza molecular (AMOVA).	57
Tabla 9. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPA01 en las poblaciones de <i>A. pallipes</i> estudiadas.	74
Tabla 10. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPA06 en las poblaciones de <i>A. pallipes</i> estudiadas.	75
Tabla 11. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPA11 en las poblaciones de <i>A. pallipes</i> estudiadas.	75
Tabla 12. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPA12 en las poblaciones de <i>A. pallipes</i> estudiadas.	76
Tabla 13. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPC04 en las poblaciones de <i>A. pallipes</i> estudiadas.	76
Tabla 14. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPC06 en las poblaciones de <i>A. pallipes</i> estudiadas.	77
Tabla 15. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPC07 en las poblaciones de <i>A. pallipes</i> estudiadas.	77
Tabla 16. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPC14 en las poblaciones de <i>A. pallipes</i> estudiadas.	78
Tabla 17. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPC15 en las poblaciones de <i>A. pallipes</i> estudiadas.	78
Tabla 18. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPC16 en las poblaciones de <i>A. pallipes</i> estudiadas.	79
Tabla 19. Número de bandas diferentes amplificadas por cebador en cada población.	80

Tabla 20. Bandas monomórficas encontradas, con 10 cebadores, en los 275 individuos analizados de las once poblaciones españolas de <i>A. pallipes</i>	81
Tabla 21. Bandas monomórficas encontradas para los cebadores OPA01, OPA06 y OPA12, en los 285 individuos analizados de las doce poblaciones de <i>A. pallipes</i> estudiadas.	81
Tabla 22. Bandas exclusivas encontradas en las poblaciones de <i>A. pallipes</i> analizadas.	83
Tabla 23. Polimorfismo estimado, con el criterio del 95%, con cada uno de los cebadores empleados y para el conjunto de cebadores,.....	85
Tabla 24. Frecuencia global y valor de χ^2 , para las distintas bandas, con el cebador OPA01.....	86
Tabla 25. Frecuencia global y valor de χ^2 , para las distintas bandas, con el cebador OPA06.....	87
Tabla 26. Frecuencia global y valor de χ^2 , para las distintas bandas, con el cebador OPA11.....	87
Tabla 27. Frecuencia global y valor de χ^2 , para las distintas bandas, con el cebador OPA12.....	88
Tabla 28. Frecuencia global y valor de χ^2 , para las distintas bandas, con el cebador OPC04.	88
Tabla 29. Frecuencia global y valor de χ^2 , para las distintas bandas, con el cebador OPC06.	89
Tabla 30. Frecuencia global y valor de χ^2 , para las distintas bandas, con el cebador OPC07.	89
Tabla 31. Frecuencia global y valor de χ^2 , para las distintas bandas, con el cebador OPC14.	90
Tabla 32. Frecuencia global y valor de χ^2 , para las distintas bandas, con el cebador OPC15.	90
Tabla 33. Frecuencia global y valor de χ^2 , para las distintas bandas, con el cebador OPC16.	91
Tabla 34. Número total de bandas por población y por cebador cuya frecuencia es significativamente menor (-) o mayor (+) que la frecuencia media de la banda en el conjunto de las once poblaciones españolas.	92
Tabla 35. Frecuencia global y valor de χ^2 , para las distintas bandas, con el cebador OPA01.....	93
Tabla 36. Frecuencia global y valor de χ^2 , para las distintas bandas, con el cebador OPA06.....	94
Tabla 37. Frecuencia global y valor de χ^2 , para las distintas bandas, con el cebador OPA12.....	95

Tabla 38. Número total de bandas por población y por cebador cuya frecuencia es significativamente menor (-) o mayor (+) que la frecuencia media de la banda en el conjunto de las doce poblaciones.....	96
Tabla 39. Valores del índice de diversidad de Shannon (H_o) en las poblaciones de <i>A. pallipes</i> analizadas para los diferentes cebadores utilizados.	97
Tabla 40. Estimaciones de la diversidad dentro de poblaciones (H_{pop}), diversidad total (H_{sp}) y proporción de diversidad dentro de poblaciones (H_{pop}/H_{sp}) y entre poblaciones ($H_{sp}-H_{pop}/H_{sp}$), para las once poblaciones españolas analizadas con 10 diez cebadores.....	99
Tabla 41. Estimaciones de la diversidad dentro de poblaciones (H_{pop}), diversidad total (H_{sp}) y proporción de diversidad dentro de poblaciones (H_{pop}/H_{sp}) y entre poblaciones ($H_{sp}-H_{pop}/H_{sp}$), para las doce poblaciones analizadas con 3 cebadores.....	99
Tabla 42. Índices de similitud.....	100
Tabla 43. Distancias genéticas de Nei entre las doce poblaciones de <i>A. pallipes</i> analizadas.....	102
Tabla 44. Valores del estadístico F_{ST} y estimaciones de N_m en las doce poblaciones de <i>A. pallipes</i>	103
Tabla 45. Resultados del análisis de la varianza molecular (AMOVA) con las poblaciones de <i>A. pallipes</i> analizadas.....	105
Tabla 46. Valores promedio de las variables morfométricas del total de machos (248) y hembras (187) de <i>A. pallipes</i> analizados en cada una de las once poblaciones españolas.	124
Tabla 47. Valores promedio de las variables morfométricas del total de hembras de <i>A. pallipes</i> analizadas (187 individuos procedentes de once poblaciones españolas).....	124
Tabla 48. Valores promedio de las variables morfométricas del total de machos de <i>A. pallipes</i> analizados (248 individuos procedentes de once poblaciones españolas).....	125
Tabla 49. Descriptiva de las variables morfométricas del total de individuos (248 machos y 187 hembras) de <i>A. pallipes</i> analizados procedentes de once poblaciones españolas.	126
Tabla 50. Descriptiva de las variables morfométricas del total de las hembras de <i>A. pallipes</i> analizadas (187 individuos procedentes de once poblaciones españolas).....	126
Tabla 51. Descriptiva de las variables morfométricas del total de machos <i>A. pallipes</i> analizados (248 individuos de once poblaciones españolas).....	127

Tabla 52. Análisis t de Student y U de Mann-Whitney de las variables morfológicas para todas las poblaciones en su conjunto.....	129
Tabla 53. ANCOVA de los ejemplares macho de las once poblaciones españolas analizadas de <i>A.pallipes</i>	132
Tabla 54. ANCOVA de los ejemplares hembra de las once poblaciones españolas analizadas de <i>A.pallipes</i>	133
Tabla 55. ANCOVA de los ejemplares macho de las ocho cuencas hidrológicas analizadas.	137
Tabla 56. ANCOVA de los ejemplares hembra de las ocho cuencas hidrológicas analizadas.	138
Tabla 57. ANCOVA de los ejemplares macho de las dos vertientes analizadas.	139
Tabla 58. ANCOVA de los ejemplares hembra de las dos vertientes analizadas.	140
Tabla 59. Resultados del PCA a partir de la matriz de correlación de las variables morfológicas, de las once poblaciones de <i>A. pallipes</i> españolas.	141
Tabla 60. Matriz de correlaciones de las medidas morfológicas (anchuras y longitudes) de los individuos de ambos sexos para las once poblaciones españolas de <i>A. pallipes</i> analizadas.	142
Tabla 61. Caracterización de las variables morfológicas de las once poblaciones españolas de <i>A.pallipes</i> analizadas. (***: p<0,001).....	143
Tabla 62. Morfotipos obtenidos en el análisis de componentes principales de las once poblaciones españolas de <i>A. pallipes</i>	147
Tabla 63. Resultados del PCA a partir de de la matriz de correlación de las variables morfológicas de los ejemplares hembra de las once poblaciones de <i>A. pallipes</i> españolas.	148
Tabla 64. Matriz de correlaciones de las medidas morfológicas (anchuras y longitudes) de las hembras para las once poblaciones españolas de <i>A. pallipes</i> analizadas.	149
Tabla 65. Caracterización de las variables morfológicas de los ejemplares hembra de las once poblaciones españolas de <i>A.pallipes</i> analizadas.	150
Tabla 66. Morfotipos obtenidos en el análisis de componentes principales de los ejemplares hembra de las once poblaciones españolas de <i>A. pallipes</i> analizadas.	154
Tabla 67. Resultados del PCA a partir de la matriz de correlación de las variables morfológicas de los ejemplares macho de las once poblaciones de <i>A. pallipes</i> españolas.	155

Tabla 68. Matriz de correlaciones de las medidas morfométricas (anchuras y longitudes) de los machos para las once poblaciones españolas de <i>A. pallipes</i> analizadas.	155
Tabla 69. Caracterización de las variables morfométricas de los ejemplares macho de las once poblaciones españolas de <i>A. pallipes</i> analizadas.	157
Tabla 70. Morfotipos obtenidos en el análisis de componentes principales de los ejemplares macho de las once poblaciones españolas de <i>A. pallipes</i> analizadas.	159

Índice de Figuras

Figura 1. Ejemplar de cangrejo autóctono, <i>Austropotamobius pallipes</i>	2
Figura 2. Localización de las poblaciones muestreadas de <i>Austropotamobius pallipes</i> en España.....	33
Figura 3. Localización de la población muestreada de <i>Austropotamobius pallipes</i> en Italia.	34
Figura 4. Detalle de la Astacifactoría de Rillo de Gallo (Guadalajara).....	36
Figura 5. Arroyo Pozuelo (Cuenca).....	37
Figura 6. Laguna de Valsemana (León).....	37
Figura 7. Detalle de la trampa empleada en los muestreos.	39
Figura 8. ADN genómico perteneciente a 18 individuos de <i>A. pallipes</i> de la población de Arroyo Cuende (CUE) en un gel de agarosa al 0,8%.	46
Figura 9. Medidas morfométricas realizadas en los individuos de <i>A. pallipes</i>	50
Figura 10. Perfiles de RAPD obtenidos utilizando el cebador OPA01 en la especie <i>Austropotamobius pallipes</i> de diferentes poblaciones.....	69
Figura 11. Perfiles de RAPD obtenidos utilizando el cebador OPA06 en la especie <i>Austropotamobius pallipes</i> de diferentes poblaciones.....	69
Figura 12. Perfiles de RAPD obtenidos utilizando el cebador OPA11 en la especie <i>Austropotamobius pallipes</i> de diferentes poblaciones.....	70
Figura 13. Perfiles de RAPD obtenidos utilizando el cebador OPA12 en la especie <i>Austropotamobius pallipes</i> de diferentes poblaciones.....	70
Figura 14. Perfiles de RAPD obtenidos utilizando el cebador OPC04 en la especie <i>Austropotamobius pallipes</i> de diferentes poblaciones.....	71
Figura 15. Perfiles de RAPD obtenidos utilizando el cebador OPC06 en la especie <i>Austropotamobius pallipes</i> de diferentes poblaciones.....	71
Figura 16. Perfiles de RAPD obtenidos utilizando el cebador OPC07 en la especie <i>Austropotamobius pallipes</i> de diferentes poblaciones.....	72
Figura 17. Perfiles de RAPD obtenidos utilizando el cebador OPC14 en la especie <i>Austropotamobius pallipes</i> de diferentes poblaciones.....	72
Figura 18. Perfiles de RAPD obtenidos utilizando el cebador OPC15 en la especie <i>Austropotamobius pallipes</i> de diferentes poblaciones.....	73
Figura 19. Perfiles de RAPD obtenidos utilizando el cebador OPC16 en la especie <i>Austropotamobius pallipes</i> de diferentes poblaciones.....	73
Figura 20. Representación gráfica en dos dimensiones del análisis de componentes principales de las 11 poblaciones españolas de <i>A. pallipes</i> estudiadas.	109

Figura 21. Representación gráfica en tres dimensiones del análisis de componentes principales de las 11 poblaciones españolas de <i>A. pallipes</i> estudiadas.	111
Figura 22. Representación gráfica en dos dimensiones del análisis de componentes principales de las 12 poblaciones (once españolas y una italiana) de <i>A. pallipes</i> estudiadas.	113
Figura 23. Representación gráfica en tres dimensiones del análisis de componentes principales de las 12 poblaciones (once españolas y una italiana) de <i>A. pallipes</i> estudiadas.	114
Figura 24. Dendrograma elaborado mediante el método UPGMA a partir de los índices de similitud interpoblacionales entre las once poblaciones españolas de <i>A. pallipes</i>	116
Figura 25. Dendrograma elaborado mediante el método UPGMA a partir de las distancias genéticas de Nei entre las once poblaciones españolas de <i>A. pallipes</i> analizadas.	117
Figura 26. Dendrograma elaborado mediante el método NJ a partir de las distancias genéticas de Nei entre las once poblaciones españolas de <i>A. pallipes</i> analizadas.	118
Figura 27. Dendrograma elaborado mediante el método UPGMA a partir de los índices de similitud entre las doce poblaciones de <i>A. pallipes</i> analizadas.	120
Figura 28. Dendrograma elaborado mediante el método UPGMA a partir de las distancias genéticas de Nei entre las doce poblaciones de <i>A. pallipes</i> analizadas.	121
Figura 29. Dendrograma elaborado mediante el método NJ a partir de las distancias genéticas de Nei entre las doce poblaciones de <i>A. pallipes</i> analizadas.	122
Figura 30. Representación gráfica en dos dimensiones del análisis de componentes principales de todos los individuos de las once poblaciones españolas de <i>A. pallipes</i>	145
Figura 31. Representación gráfica en dos dimensiones del análisis de componentes principales de los ejemplares hembra de las once poblaciones españolas de <i>A. pallipes</i>	152
Figura 32. Representación gráfica en dos dimensiones del análisis de componentes principales de los machos de las once poblaciones españolas de <i>A. pallipes</i>	158

Introducción

1 INTRODUCCIÓN

1.1 TAXONOMÍA, DISTRIBUCIÓN Y ECOLOGÍA DEL CANGREJO DE RÍO

El cangrejo de río *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) es la única especie autóctona de cangrejo presente en la Península Ibérica y uno de los mayores macroinvertebrados de nuestra fauna continental (Figura 1).



Figura 1. Ejemplar de cangrejo autóctono, *Austropotamobius pallipes*.

En Europa se presentan cinco especies de cangrejos autóctonas pertenecientes a dos géneros, *Astacus* y *Austropotamobius*, ambas incluidas dentro de la Familia *Astacidae*. La taxonomía de las especies europeas se ha revisado numerosas veces en el último siglo. Hasta hace poco tiempo, el consenso en Europa occidental era reconocer cinco especies europeas, *Astacus astacus*, *Astacus leptodactylus*, *Astacus pachypus*, *Austropotamobius torrentium* y *Austropotamobius pallipes*, pero es probable que con la utilización de las nuevas

técnicas moleculares esta clasificación se vea modificada ligeramente (ver Tabla 1).

Filo Arthropoda
Subfilo Crustacea
Clase Malacostraca
Orden Decapoda
Infraorden Astacida Scholtz & Richter, 1995
Superfamilia Astacoidea De Haan, 1841
Familia Astacidae, Latreille, 1802-1803
Género <i>Astacus</i> Fabricius, 1775
<i>Astacus astacus</i> (Linnaeus, 1758)
<i>Astacus leptodactylus</i> Eschscholtz, 1823
<i>Astacus pachypus</i> (Rathke, 1837)
Género <i>Austropotamobius</i> Skorokov, 1908
<i>Austropotamobius pallipes</i> (Lereboullet, 1858)
<i>Austropotamobius torrentium</i> (Schränk, 1803)

Tabla 1. Taxonomía de la Familia Astacidae.

La posición taxonómica de los cangrejos ibéricos dentro de la especie no está suficientemente definida, estando adscritos a la subespecie *Austropotamobius pallipes lusitanicus* por Mateus (1934), si bien su validez está sometida a debate y no es reconocida de forma unánime por los especialistas. Los primeros estudios acerca de la diversidad infraespecífica de *A. pallipes* están basados en caracteres morfológicos y merísticos, y en su distribución geográfica (Bott, 1950). Bott (1950) aceptaba la existencia de, al menos, tres grupos de subespecies dentro de la especie *A. pallipes*: *A. pallipes pallipes*, distribuida por las Islas Británicas, Francia, Suiza, norte de Italia y Córcega, *A. pallipes italicus*, distribuida por Dalmacia, Italia y Suiza, y *A. pallipes lusitanicus*, distribuida por la Península Ibérica. En la actualidad aún existen

muchas discrepancias entre los estudios sobre el estatus taxonómico de estos grupos. Por ejemplo, para Karaman (1963) los dos últimos taxones, *A. pallipes* *italicus* y *A. pallipes lusitanicus*, pertenecerían a una especie distinta, *A. italicus*.

Estudios recientes (Grandjean *et al.*, 2002) proponen una nueva clasificación para el género *Austropotamobius* basada en trabajos con ADN mitocondrial, que comprende cuatro especies: *A. torrentium*, *A. berndthauseri*, *A. pallipes*, y *A. italicus*. Esta última especie, *Austropotamobius italicus*, con tres subespecies: *italicus*, *carinthiacus* y *carsicus*. Y así, las poblaciones italianas e ibéricas de cangrejo de río que hasta ahora hemos conocido como *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) pasarían a llamarse *Austropotamobius italicus* (Faxon, 1914). Nosotros, no obstante, mantendremos la antigua nomenclatura a lo largo de este trabajo, por ser la establecida y generalmente utilizada.

En la actualidad, la distribución original en la Península Ibérica de la especie *A. pallipes*, conocido comúnmente como cangrejo autóctono, no está clara. En 1983 Albretch (Holdich, 2002a) opinaba que los cangrejos de la especie *A. pallipes*, no vivían originalmente en España refiriéndose a una cita de 1642 en la que se afirmaba que no existían. Sin embargo, encontramos referencias históricas acerca del cangrejo en 1783 de Asso (Bolea, 1995) y en 1850 (Madoz, 1850-1853). Huxley en 1881 (Holdich, 2002a) afirmó haber visto en las proximidades de la provincia de Madrid ejemplares de los mismos. En 1880 Holdsworth (Holdich, 2002a) también comentó la presencia de *A. pallipes* en varios ríos cercanos a Madrid (Río Henares, Río Jalón y en un afluente del Río Duero). Y por último, Balss en 1925 (Holdich, 2002a) apuntó la presencia natural de cangrejos en el Río Guadiana.

Por otro lado, tampoco está hoy en día aclarado el origen de la especie en nuestro país y hay varias teorías al respecto. Santucci y cols. (1997) y Grandjean y cols. (2001), hacen referencia a la procedencia de las poblaciones españolas de *A. pallipes* desde Italia, debido a la escasa diferenciación

genética encontrada entre las poblaciones del norte de Italia y las españolas. Anteriormente Laurent (1988) ya había apuntado esta idea. Otros autores parecen estar de acuerdo también con el posible origen desde Italia, aunque discuten la procedencia a partir de dos introducciones diferentes (Royo *et al.*, 2003). Según esto, la especie *A. pallipes* no sería nativa, tal y como se ha venido pensando hasta nuestros días.

Nos encontramos pues ante una considerable carencia de información histórica acerca del origen y la distribución del cangrejo de río en España.

Los individuos de la Familia *Astacidae* se distribuyen desde el oeste de los Montes Urales hasta la Península Ibérica, en las Islas Británicas y el sur de Escandinavia. Más adelante hablaremos con detalle de la distribución del cangrejo de río, *Austropotamobius pallipes*, en el caso particular que nos ocupa, España.

La distribución y abundancia de *Austropotamobius pallipes* han ido descendiendo de forma drástica en las últimas décadas, afectando tanto a las poblaciones españolas como a las del resto de Europa.

En España la distribución del cangrejo autóctono depende en gran medida de la geomorfología. Los ríos de nuestro país son de carácter mediterráneo, sometidos a fuertes variaciones estacionales alternando períodos de sequía con riadas o avenidas de intensidad variable.

El clima mediterráneo se caracteriza por presentar dos períodos máximos de lluvias, en primavera y otoño, y son los tramos medios y bajos de los ríos los más afectados por esta temporalidad. Estos tramos presentan pocos afluentes, pendiente suave, flujo laminar, deposición de materiales aluviales (grava y arena) y acusada variación estacional del caudal.

Las riadas pueden llegar, en cuencas sin regular, a modificar el cauce y el período seco puede producir la interrupción del flujo de agua originando

pozas intermitentes o tramos sin agua. Y es precisamente en estas zonas, aisladas del resto de la red fluvial, bien por tramos que quedan en seco o por barreras físicas, donde suele aparecer el cangrejo.

Sus poblaciones se presentan en cuencas de litologías carbonatadas (zonas calizas, con pH neutros y ácidos), en aguas poco profundas, con buena vegetación de ribera y abundancia de refugios. En España su rango altitudinal actual abarca desde los 240 metros a los 1520 metros (sobre el nivel del mar), la conductividad (medida de la resistencia del agua al flujo eléctrico, y proporcional a la salinidad) puede variar entre 50 $\mu\text{S cm}^{-1}$ y 1690 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (aunque los valores más comunes se encuentran entre 450 y 900 $\mu\text{S cm}^{-1}$) y las temperaturas que acepta son generalmente inferiores a los 16-18°C, entre 5 y 20°C (Alonso *et al.*, 2000).

Hoy en día encontramos las poblaciones de cangrejo en las cabeceras de cuenca, generalmente aisladas del resto de la red fluvial, bien por zonas que quedan secas o por diferentes barreras físicas, ocupando tramos pequeños, que no superan el kilómetro y charcas, naturales o seminaturales. Esto significa que las poblaciones están muy fragmentadas y además aparecen en los márgenes de su primitivo hábitat.

El papel ecológico que desempeñan los cangrejos de río es muy importante en la dinámica de los ecosistemas fluviales en los que está presente (Rabeni *et al.*, 1995). La elevada biomasa que pueden llegar a representar dentro de la comunidad macroinvertebrada de ríos y lagunas, junto con la baja tasa de renovación de sus poblaciones y sus hábitos alimenticios (que abarcan prácticamente la totalidad de los niveles tróficos) los convierten en una especie clave en la regulación de los ecosistemas que habitan.

A este elevado valor ecológico hay que añadir la gran trascendencia social del cangrejo, especialmente en el ámbito rural de nuestro país. Por

ejemplo, en Castilla-La Mancha a principios de los años setenta se estimaban capturas anuales de cangrejo autóctono de 500 Tm, siendo tal actividad fuente de empleo de numerosas familias, existiendo cooperativas de pescadores profesionales y generando decenas de miles de jornadas de ocio a través de su pesca deportiva, lo que constituía un elemento básico en la tradición cultural, deportiva y gastronómica de la región.

Su pesca, además de ser una actividad muy popular, reportaba importantes ingresos a los pescadores y a las Administraciones que concedían licencias para la misma.

Dentro de la Península Ibérica, el cangrejo autóctono representa uno de los casos más dramáticos de regresión faunística. En muy poco tiempo, prácticamente en la década de los años ochenta, los cangrejos pasaron de ser un elemento de la fauna muy abundante en los cauces ibéricos a estar seriamente amenazados de extinción (Alonso *et al.*, 2000).

En 1964, antes de la irrupción de la afanomicosis, enfermedad producida por el hongo *Aphanomyces astaci* (Schikora, 1903; 1906), *A. pallipes* se distribuía en la Península Ibérica de manera bastante generalizada y, principalmente, en las provincias de Burgos, Palencia, Ciudad Real, Guadalajara, Cuenca, Soria, La Rioja, Zamora, Segovia, Valladolid, Jaén, Ávila, Navarra, Álava, Zaragoza, Teruel, Salamanca, Madrid y Toledo (Torre y Rodríguez, 1964). En menor densidad poblacional también se encontraba en Lugo, Orense, Asturias, Cantabria, Guipúzcoa, Vizcaya, Huesca, Lérida, Gerona, Tarragona, Barcelona, Castellón, Valencia, Murcia y León. Así pues, la distribución del cangrejo de río abarcaba prácticamente toda la España caliza hasta el sur de la provincia de Granada, límite meridional de la distribución mundial de la especie (Laurent, 1988; Gil, 1999). Únicamente no se encontraba en ninguna de las dos provincias extremeñas, en Almería, Islas Canarias y Baleares.

1.2 SITUACIÓN ACTUAL DE LAS POBLACIONES DE CANGREJO AUTÓCTONO

Las poblaciones de cangrejo de río muestran una serie de características que las hacen especialmente vulnerables, tal y como se ha comentado anteriormente. Aparecen en zonas marginales de su antiguo hábitat, aisladas del resto de la red fluvial, y muy fragmentadas, dificultando la recolonización. Y sin embargo, pueden ser localmente muy densas (hasta 10-15 cangrejos por m²), lo que las sigue haciendo vulnerables al furtivismo (Alonso *et al.*, 2000).

Actualmente las poblaciones están muy disminuidas y ha desaparecido de las provincias de Alicante, Murcia y Salamanca. Su presencia es dudosa en Ciudad Real, Segovia y Valladolid, y en el resto de provincias donde se mantiene, sus poblaciones se han reducido drásticamente. Algunos autores han estimado que la tasa de regresión del cangrejo de río en nuestro país se encuentra entre el 30 y el 50% cada cinco años (Temiño y Sáez-Royuela, 1998; Albade *et al.*, 1991). *A. pallipes* no aparece, como hemos dicho, en las Islas Canarias ni Baleares y en Portugal su estado es crítico (Alonso *et al.*, 2000).

Los motivos de la regresión, tanto en España como en el resto de Europa, los encontramos en la introducción de otras especies exóticas de cangrejos, portadoras de enfermedades tan importantes como la afanomicosis y en la alteración provocada por el hombre en los ecosistemas fluviales. A esto se une el incremento de hábitats muy simplificados (ríos canalizados, regulados y/o contaminados) en los que las especies de carácter invasor tienen mayor facilidad para instalarse y prosperar.

Las alteraciones del hábitat que más han influido en el descenso del número de poblaciones son la destrucción de la estructura del cauce, especialmente resultado de las canalizaciones con los programas de prevención de avenidas, y la concentración parcelaria. También los estiajes

extremos, que secan completamente tramos marginales de la red fluvial donde se refugia la especie, las captaciones de agua para uso doméstico y agrario sobre cauces con muy escaso caudal estival y la destrucción de la vegetación de ribera en entornos agrícolas. No podemos dejar a un lado la contaminación orgánica ligada a explotaciones agropecuarias y el empleo de productos tóxicos, particularmente insecticidas, en los sectores agrícola y forestal (Galindo *et al.*, 2000). Y por último el furtivismo, ya sea para consumo particular o para comercialización clandestina en establecimientos públicos, que además de reducir el número de individuos de las poblaciones es una importante vía de transmisión de la afanomicosis por la falta de desinfección en los utensilios de pesca.

En la actualidad la alteración de los ecosistemas fluviales se considera la causa más importante del declive de las poblaciones de cangrejo autóctono. La desaparición de las poblaciones tiene graves consecuencias ecológicas y ambientales sobre las aguas continentales, ya que el cangrejo representa un importante nivel trófico y su presencia es imprescindible para el mantenimiento del equilibrio de los ecosistemas (Momot *et al.*, 1978). Como consecuencia de esta alteración, la mayoría de las poblaciones están divididas en subpoblaciones relativamente pequeñas con un intercambio limitado de individuos.

La primera introducción de especies exóticas de la que se tiene constancia en España es de cangrejo noble, *Astacus astacus*, introducido en 1962 por el Servicio Nacional de Pesca Fluvial y Caza. El cangrejo blanco de río, *Procambarus zonangulus*, se introdujo en 1974 en las marismas del Guadalquivir, junto con el cangrejo rojo, *Procambarus clarkii* (Habsburgo-Lorena, 1979). El cangrejo turco, *Astacus leptodactylus*, fue introducido con fines de acuicultura en 1975 en la provincia de Valladolid (Habsburgo-Lorena, 1979); un ejemplar hembra de esta especie fue visto en 2003 en un

mercado de Madrid (Alonso, comunicación personal) aunque no se ha establecido en libertad. El cangrejo australiano o yabby, *Cherax destructor*, se encontró en pozas en Aragón (Bolea, 1995) y en Navarra (Diéguez-Uribeondo, 1999). El cangrejo de río americano, *Orconectes limosus*, muy abundante en Francia, se ha encontrado ocasionalmente en mercados (Bolea, 1995), pero afortunadamente nunca en libertad.

Pero las dos especies alóctonas introducidas que han tenido mayor repercusión han sido dos cangrejos americanos, el rojo (*Procambarus clarkii*) y el señal (*Pacifastacus leniusculus*).

El cangrejo rojo, americano o de las marismas, *Procambarus clarkii*, se introdujo entre 1973 y 1974 en Badajoz y en las marismas del Guadalquivir (Habsburgo-Lorena, 1979, 1986). Es una especie oportunista, omnívora, de rápido crecimiento, elevada fertilidad, que presenta gran tolerancia a los cambios ambientales y euriplasticidad fisiológica, colonizando gran parte de los cursos de agua de nuestro país. Su dispersión fue muy rápida, favorecida especialmente por la participación activa de los pescadores comerciales y deportivos. Éstos veían desaparecer la especie autóctona y no eran conscientes de los graves problemas ecológicos que podía generar la introducción del cangrejo rojo, puesto que carecían de información. Y también su comercialización en vivo ha hecho que *P. clarkii* sea muy asequible para los pescadores en áreas no habitadas por la especie.

Al ser *P. clarkii* una especie que, tras su introducción, influye de manera muy importante en el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos (Momot *et al.*, 1978; Holdich, 1987; Momot 1995) y con gran capacidad de invasión, el impacto directo que puede provocar su introducción al ecosistema se puede analizar desde varias perspectivas. La primera es su potencialidad de alterar la producción total de los ecosistemas (Momot, 1995). La segunda hace referencia a sus hábitos alimenticios, ya que como gran depredador carnívoro, mientras busca animales ingiere grandes

cantidades de herbáceas y detritus; a altas densidades de cangrejos, el forrajeo se puede extender tanto que modifica totalmente el hábitat al destruir los tapetes microbianos y las praderas de macrófitos (Momot *et al.*, 1978; Feminella y Resh, 1986; Lodge y Lorman, 1987; Chambers *et al.*, 1990; Olsen y Lodge, 1991). Y por último, se debe considerar al cangrejo como presa o alimento de otros animales, tanto invertebrados como vertebrados (Momot *et al.*, 1978; Lodge, 1993).

La otra especie exótica a destacar es el cangrejo señal, *Pacifastacus leniusculus*, que se introdujo entre 1974 y 1975 en dos astacifactorías, una en el río Cifuentes, en la provincia de Guadalajara, y otra en el río Ucero, en Soria (Habsburgo-Lorena, 1979). Al contrario de lo sucedido con el cangrejo rojo, *P. leniusculus* fue introducida por la Administración en Comunidades como Castilla y León, País Vasco y Navarra. Tiene mayor capacidad de adaptación que el cangrejo rojo a los tramos altos de las cuencas. Además, su crecimiento y maduración sexual son más lentos que en el cangrejo rojo, aunque más rápidos que los del cangrejo autóctono. Su mayor tamaño, fecundidad y agresividad le hacen desplazar al cangrejo autóctono cuando conviven en un mismo tramo fluvial y no podemos olvidar que también es transmisor de la afanomicosis.

La introducción de especies alóctonas trae consigo una serie de consecuencias importantes en los ecosistemas fluviales. Williamson, en 1996, realizó una clasificación de los impactos más importantes que producen las especies introducidas en las comunidades biológicas, entre las que se encuentran la competencia por el espacio y el alimento, la alteración de los procesos ecológicos y efectos que alteran la estructura trófica. Lodge (1993) menciona además la alteración del hábitat, la introducción de enfermedades y parásitos y la hibridación con especies nativas.

No obstante, la consecuencia más devastadora para *A. pallipes* es que los cangrejos de origen americano son transmisores de la afanomicosis,

introducida en Europa en 1860 (Diéguez *et al.*, 1997a) y en la Península Ibérica alrededor de 1970. Esta enfermedad provoca una mortalidad del 100% entre las poblaciones de cangrejo autóctono afectadas (Cerenius y Söderhäll, 1992; Diéguez-Uribeondo *et al.*, 1997b).

La afanomicosis o peste del cangrejo, está producida por un hongo acuático parásito, *Aphanomyces astaci* Schikora, 1903. Existen distintas cepas, asociadas a cada una de las especies introducidas, que muestran diferencias ecológicas y epidemiológicas (Huang *et al.*, 1994). El diagnóstico de la enfermedad no es sencillo, siendo precisa la realización de ensayos de reinfección para confirmarlo. La dificultad de diagnóstico y la ausencia de medios han llevado a asignar directamente cualquier mortandad masiva en la última década a la afanomicosis, enmascarando quizás la incidencia de otras causas.

Respecto a la situación actual de la afanomicosis en nuestro país, existe un gran desconocimiento debido a que el seguimiento y análisis de las mortandades de cangrejo autóctono son escasos, al igual que los análisis de las poblaciones de cangrejos introducidas, lo que dificulta la conservación y recuperación de las poblaciones de *A. pallipes*.

Pese al acuerdo sobre las causas de regresión, existe un notable debate en cuanto a las medidas de gestión a adoptar para corregir esta situación, especialmente en lo que respecta a la gestión de las poblaciones de cangrejos introducidos, y particularmente de cangrejo señal.

Al contrario de las medidas que se están adoptando en otros países europeos, en algunas zonas de España la mayor parte del esfuerzo se está centrando en la repoblación con cangrejo señal, especie vector de la afanomicosis, por su parecido morfológico y gastronómico con la especie autóctona.

Todos estos factores de amenaza, tanto sobre la especie autóctona como sobre su hábitat, se ven agravados por una falta generalizada de

información a todos los niveles, no sólo entre el público sino también dentro de las Administraciones Públicas.

Los distintos intentos por recuperar las poblaciones de cangrejo de río y controlar la enfermedad, han producido importantes avances en el área del conocimiento general de diferentes aspectos de su biología, ecología, patología e inmunología. A pesar de estos avances, la investigación sobre *A. pallipes* en aguas ibéricas es relativamente escasa, lo que se refleja en el bajo número de publicaciones existentes. Además de dos obras monográficas clásicas, Pardo (1942) y Torre y Rodríguez (1964), existen publicaciones centradas en la descripción de inventarios provinciales (Celada *et al.*, 1989), sobre su hábitat y ecología (Celada *et al.*, 1984; Celada y Gaudioso, 1985), incubación en condiciones de laboratorio (Carral *et al.*, 1988; Pérez *et al.*, 1999), desarrollo embrionario (Celada *et al.*, 1991), morfometría (Celada *et al.*, 1987), diferentes aspectos de su biología (alimentación, reproducción...), patologías que le afectan (Diéguez-Uribeondo y Söderhäll, 1993; Diéguez-Uribeondo *et al.*, 1997b; Diéguez-Uribeondo y Temiño, 1998), evolución y situación a nivel estatal (Celada *et al.*, 1986, Carral *et al.*, 1993; Diéguez-Uribeondo y Rueda, 1994; Alonso *et al.*, 2000), en la provincia de Granada (Gil y Alba-Tercedor, 1998; Gil, 1999), en Aragón (Bolea, 1995), en Asturias (De la Hoz, 1997), en Castilla-León (Campos y Quiroga, 1988; González *et al.*, 1989; Mondedeu y Ortuño, 1989; Llamazares y Celada, 1990; Gómez de Diego, 1991; López y Garrido, 1994; Lezárraga, 1995; Pérez-Cecilia *et al.*, 1997; Temiño y Sáez-Royuela, 1998), en Castilla-La Mancha (Lozano y Martín, 1988; Alonso y Martínez, 1998), en Cataluña (Rey, 1994), en el País Vasco (Mendoza y Unzu, 1997), en Navarra (Ayerra *et al.*, 1986; Aldabe *et al.*, 1991; Diéguez-Uribeondo *et al.*, 1997a; Diéguez-Uribeondo, 1999) y un único estudio genético que incluye además de poblaciones de cangrejo autóctono, cangrejo señal y rojo (Zarazaga, 1993). Se trata, fundamentalmente, de información recopilada a través de estudios e inventarios referida a provincias de forma individual y aislada. En la mayoría de los casos esta

información no está agrupada por Comunidades Autónomas o por cuencas hidrográficas, ni existen estudios comparativos entre los datos obtenidos de diferentes provincias. Así pues, nos encontramos ante una enorme laguna sobre el conocimiento acerca de la estructura de las poblaciones de cangrejo de río en España, tanto desde el punto de vista genético como morfométrico.

1.3 LEGISLACIÓN

La especie objeto de este estudio tiene un valor de conservación destacado dentro del contexto europeo. Se incluye en la Lista Roja de la U.I.C.N. (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) en la categoría de "vulnerable" (Baillie y Groombridge, 1996) y en el Anexo III del Convenio de Berna 1982 (tratado internacional relativo a la conservación de la vida silvestre en el territorio europeo) referido a especies protegidas aún cuando no de forma estricta (el Anexo II está dedicado a las especies de fauna "estrictamente" protegidas). Y en el Anexo V de la Directiva 92/43/CEE relativa a la protección de Hábitats Naturales y Seminaturales y Fauna y Flora Silvestres, con respecto a las especies cuya recogida y explotación pueden ser objeto de medidas de gestión (el Anexo IV trata de las que requieren una protección estricta).

La legislación española relativa a la conservación del cangrejo de río autóctono es compleja puesto que incluye la legislación de la conservación de la naturaleza, de la pesca continental y del comercio de especies silvestres, tanto en el ámbito nacional como autonómico.

La mayoría de los gobiernos regionales han publicado ya sus propias actuaciones relativas a la conservación de la naturaleza y pesca interior. Sin embargo, la legislación del comercio de especies silvestres sigue siendo un asunto nacional. Puesto que la legislación regional no se ha desarrollado todavía, se aplican las regulaciones nacionales.

A pesar de tratarse de una especie con riesgo de extinción en todo el país, el Decreto 439/1990 no lo incluye como especie catalogada. En la actualización del Catálogo Nacional de especies amenazadas se incluye al cangrejo de río como especie “vulnerable” por su tendencia poblacional regresiva que le ha llevado a desaparecer de una gran parte de su área de distribución anterior (BOE nº 149 de 23 de junio de 2003).

En aquellas Comunidades Autónomas donde el nivel de protección sea inferior al de “vulnerable”, se mantendrá lo establecido en el Catálogo Nacional. Esta medida afecta principalmente a: Galicia, Asturias, Cantabria, Castilla y León, País Vasco, Cataluña, Andalucía y Madrid.

No hay referencias para regular la captura de cangrejos en España antes de la “Ley Nacional de Pesca” de 1907 (Pardo, 1950-51; 1953). Las restricciones pesqueras han cambiado varias veces durante este último siglo. A principios de los 70 existían un conjunto de regulaciones respecto a la captura de cangrejo autóctono (que incluían, entre otras, un único modo legal de pescar con nasas/trampas, una talla mínima de captura, un máximo de 8 nasas por pescador, un límite de 8 docenas de cangrejos por pescador y día, y la necesidad de una licencia de pesca anual).

Es importante analizar la legislación relacionada con la pesca de las especies introducidas en España. En relación a la captura del cangrejo rojo, *Procambarus clarkii*, se puede pescar en la mayoría de las provincias de España a lo largo de todo el año, sin limitaciones de talla (talla mínima de captura) ni cupo, pero sí está establecido un límite de nasas y restringidos los sitios de pesca. En los últimos diez años la comercialización en vivo del cangrejo rojo ha estado sujeta a numerosos cambios. Tres Comunidades Autónomas, Cataluña, País Vasco y Navarra tienen prohibida la comercialización en vivo de cangrejo rojo y en la provincia de Navarra se ha observado un descenso considerable en su dispersión (Diéguez-Urbeondo y

Múzquiz, 1999). En el resto de España, por el contrario, el cangrejo rojo se puede vender vivo y de hecho está disponible en los comercios.

Respecto al cangrejo señal, *Pacifastacus leniusculus*, su venta no está permitida a nivel nacional. La especie está presente en, al menos, diez Comunidades Autónomas (Castilla y León, País Vasco, Cantabria, Aragón, Valencia, Madrid, Castilla la Mancha, Andalucía, Navarra y Cataluña) y en cinco de ellas, Castilla-León, Navarra, Cantabria, Madrid y País Vasco se permite su captura (en zonas limitadas, con un número de entre diez y treinta y seis cangrejos por pescador y distintas tallas legales; en Madrid está permitida la captura sin límite de talla ni de número de ejemplares). Precisamente en estas cinco Comunidades Autónomas (Castilla-León, Navarra, Cantabria, Madrid y País Vasco) se han llevado a cabo, desde finales de los 80, programas de recuperación (Álvarez *et al.*, 1989; Carral *et al.*, 1993) y en Castilla-León además se están planificando más reintroducciones (Pérez-Cecilia *et al.*, 1997).

A lo largo de los últimos años la legislación se ha ido modificando con el fin de evitar la dispersión de las especies alóctonas, siguiendo el ejemplo de la legislación escandinava (Skurdal y Taugbøl, 1992). Por ejemplo, en Castilla-La Mancha, Navarra y Cataluña los animales deben sacrificarse una vez son capturados, pero esta norma no se cumple casi nunca.

Tal como marca el Real Decreto 1997/95, norma que traspone en España la Directiva de Hábitats, la especie *Austropotamobius pallipes* es legalmente susceptible de aprovechamiento mediante normas de pesca fluvial, siempre y cuando se realice de forma compatible con el mantenimiento de dicha especie en un estado de conservación favorable. Parece poco probable que hoy por hoy los gestores ambientales de las Comunidades Autónomas hagan uso de esa posibilidad que ofrece la Directiva de Hábitats. Pero lo cierto es que el ordenamiento jurídico interno español lo permite a menos que el cangrejo de río sea incluido en el Catálogo

Nacional de Especies Amenazadas o bien en los correspondientes catálogos de las Comunidades Autónomas (Álvarez, 2000), como ya han hecho seis de ellas (Aragón, Castilla-La Mancha, Cataluña, Extremadura, Navarra y La Rioja).

Sólo existen dos planes de actuación aprobados y otros tres, el de Castilla-La Mancha, Aragón y Comunidad Valenciana, están en elaboración. Navarra [Decreto Foral 143/1996, de 11 de marzo, BON núm. 38, de 27 de marzo de 1996, acompañado por el Decreto Foral 144/1996, de 11 de marzo, BON núm. 38, de 27 de marzo de 1996, por el que se aprueba el Plan de Ordenación de los cangrejos alóctonos en Navarra] ha desarrollado un plan de recuperación, que otorga al cangrejo autóctono el máximo nivel de protección por medio de la clasificación de esta especie como en peligro de extinción (Diéguez-Uribeondo *et al.*, 1997a) y también La Rioja (Decreto 47/2000 de 7 de septiembre, BOR, nº 114, de 12 de septiembre).

Como puede verse en la Tabla 2 en el resto de España no se ha implantado ningún plan de recuperación para la especie autóctona, cosa sorprendente puesto que la situación en la mayoría de las provincias es bastante crítica.

Comunidad Autónoma	Catálogo de Especies Amenazadas y Categoría (modif. Ley 4/1989)	Catalogación	Plan de Recuperación
ANDALUCÍA	Flora: Decreto 104/1994, de 10 de mayo	No	En preparación
ARAGÓN	Decreto 49/1995, de 28 de marzo de la Diputación General de Aragón	Vulnerable	En preparación
ASTURIAS	Decreto 32/90, de 8 de marzo, por el que se crea el Catálogo Regional de Especies Amenazadas de la Fauna Vertebrada	No	No
CANARIAS	Decreto 151/2001, de 23 de julio, por el que se crea el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias	No	No
CANTABRIA	No	No	No
CASTILLA-LA MANCHA	Decreto 33/1998, de 05-05-98 (DOCM, 15 de mayo de 1998)	Vulnerable	En preparación
CASTILLA-LEÓN	No	No	No
CATALUÑA	No	Baja sensibilidad*	No
C. VALENCIANA	Decreto 32/2004, de 27 de febrero	En peligro	En preparación
EXTREMADURA	Decreto 37/2001 de 6 de marzo	En peligro	No
GALICIA	No	No	No
MADRID	Decreto 26 de marzo 1992, núm. 18/1992	No	No
MURCIA	Ley 7/1995, de 21 de abril, de la Fauna Silvestre, Caza y Pesca Fluvial	No	No
NAVARRA	Decreto Foral 563/1995, de 27 de septiembre: Catálogo de Especies Amenazadas de Navarra. Decreto Foral 142/1996, de 11 de marzo, (BON núm. 38, de 27 de marzo de 1996): Inclusión del cangrejo de río autóctono en el Catálogo de Especies Amenazadas de Navarra	En peligro	Decreto Foral 142/1996, de 11 de marzo BON núm. 38, de 27 de marzo de 1996
PAÍS VASCO	Decreto 167/1996, de 9 de julio	No	No
LA RIOJA	Decreto 59/1998, de 9 de octubre (B.O.R. 123 de 13 de octubre de 1998).	En peligro	Decreto 47/2000, BOR 114, de 12 de septiembre de 2000
ESPAÑA	BOE, nº 149 de 23 de junio de 2003	Vulnerable	No

Tabla 2. Legislación autonómica y nacional relativa a la conservación del cangrejo autóctono *Austropotamobius pallipes*.

*: Está recogida como especie "de baja sensibilidad", aunque no existe una catalogación análoga a la de las categorías recogidas en la Ley 4/1989 o legislación autonómica equivalente.

1.4 ESTUDIOS GENÉTICOS Y MORFOMÉTRICOS

La información disponible sobre las poblaciones españolas de *Austropotamobius pallipes*, tanto a nivel genético como morfométrico, es muy escasa. De hecho, no existe ningún trabajo de amplitud que nos pueda informar sobre la estructura poblacional de esta especie.

Y, resulta evidente, que la información básica en el conocimiento de una especie de interés desde un punto de vista ecológico y de la conservación, reside en su estructura poblacional, en la variabilidad y diversidad contenidas en sus poblaciones.

Cualquier estrategia dirigida a la conservación de una especie, se inicia necesariamente con el conocimiento detallado de su distribución y situación poblacional, cuestión que incluye el inventario de sus efectivos. Estas estrategias son eficientes cuando no sólo se dispone de datos ecológicos sino también del conocimiento de la estructura poblacional geográfica (Grandjean y Souty-Grosset, 2000).

El cangrejo de río, una vez generalizada la dramática regresión de sus poblaciones, ha sido objeto de diversos inventarios realizados como base para su conservación. Como ejemplos de países donde se han inventariado las poblaciones de astácidos cabe citar a Francia, Alemania, Reino Unido, Irlanda, Estonia, Lituania y los países escandinavos. La Península Ibérica no ha estado exenta del interés por la conservación de los cangrejos y, en consecuencia, se han realizado distintos trabajos, tanto en España (León, Burgos, Navarra, Álava, Guipúzcoa, Vizcaya, Aragón, Cuenca) como en Portugal, relativos a conocer la localización, densidad y estado de conservación de sus poblaciones.

En un principio los métodos utilizados para conocer la variabilidad se han basado en caracteres morfológicos y merísticos. En España son muy escasos los estudios sobre morfometría de *A. pallipes* pues únicamente se han

llevado a cabo tres trabajos (Celada *et al.*, 1987; Gómez de Diego, 1991; Iglesias *et al.*, 1998). Celada y cols. (1987) compara la morfometría externa de dos especies de cangrejos con fines productivos, por un lado *Austropotamobius pallipes* en la provincia de León y por otro, *Pacifastacus leniusculus* procedente de una astacifactoría de Soria, encontrando que *P. leniusculus* tiene mejores posibilidades productivas que el cangrejo autóctono. En el trabajo de Gómez de Diego (1991) se recogieron datos en la provincia de Ávila, entre otro tipo de información, sobre dos medidas morfométricas referidas a longitudes de los individuos en varias poblaciones. Y del trabajo de Iglesias y cols. (1998) se desprende la diferenciación sexual entre machos y hembras, pertenecientes a la provincia de Lugo, en función de variables morfométricas de anchura y longitud totales y de pinzas, y de peso. Así pues, se trata de tres estudios, muy locales, sobre poblaciones de cangrejo de río en diferentes provincias españolas en los que se analiza una pequeña parte de la morfometría fundamentalmente con fines productivos. Fuera de nuestras fronteras los trabajos sobre morfometría de *A. pallipes* también son escasos (Brown y Bowler, 1978; Attard y Vianet, 1985; Mori *et al.*, 2001). El objetivo que persiguen estos trabajos se basa en análisis multivariantes que puedan servir como herramienta a la hora de elaborar y desarrollar programas de repoblación.

Hace unas décadas los estudios basados en marcadores morfológicos empezaron a completarse con estudios genéticos, lo que ha hecho que en los últimos años la genética de la conservación sea un campo en continuo crecimiento (Sutherland, 2000; León-Quinto *et al.*, 2003).

De hecho, la descripción de la variación genética de una población es el dato básico de los estudios poblacionales y evolutivos y uno de los mayores esfuerzos de la genética evolutiva ha sido caracterizar el tipo y

cantidad de variación genética existente en las poblaciones, naturales o de laboratorio, de numerosos organismos.

El conocimiento de los niveles y la distribución de la variabilidad genética de las poblaciones es de primordial interés para la gestión y conservación de las mismas.

El estudio de los niveles y patrones de distribución de variación genética dentro de una especie permite conocer su estructura poblacional, identificar diferentes poblaciones y definir las ESUs (unidades evolutivas significativas) para su conservación (Moritz, 1994), u OCUs (unidades operacionales de conservación) (Doadrio *et al.*, 1996). Y por último, ayuda a definir los hábitats críticos con el fin de determinar las áreas que tienen la mayor parte de diversidad genética de la especie.

Los efectos genéticos sobre poblaciones en peligro han sido estudiados ampliamente (Nei *et al.*, 1975; Lande, 1995; Llorens *et al.*, 2004, etc) prediciendo una tendencia a la pérdida de variación genética por deriva de manera más rápida que en poblaciones más grandes. Esta pérdida puede tener consecuencias negativas para su viabilidad (Gilpin, 1991). La variabilidad genética se considera vital tanto a corto (fluctuaciones ambientales) como a largo plazo (cambio evolutivo) (Martínez, 2002).

Hoy en día se ha desarrollado una amplia variedad de métodos moleculares para examinar los niveles de variabilidad genética en las poblaciones de todo tipo de organismos. A principios de los años sesenta comienza a utilizarse una tecnología basada en el análisis molecular de isoenzimas (“diferentes formas moleculares de enzimas con la misma especificidad de sustrato”) mediante electroforesis de proteínas (Hunter y Market, 1957). Los polimorfismos para tamaño y/o carga eléctrica se detectan gracias a su diferente movilidad electroforética y mediante tinciones específicas.

Es un método relativamente económico desde el punto de vista técnico y rápido, pero no está exento de inconvenientes tales como que el número de sistemas enzimáticos a estudiar es limitado, lo que disminuye su capacidad de discriminación, que la expresión de algunas isoenzimas es sensible a las condiciones ambientales externas, su baja resolución ya que sólo detecta un tercio de la variación total y que es un sistema de muestreo “sesgado”.

Los primeros estudios de genética de poblaciones utilizando la técnica de electroforesis de proteínas se llevaron a cabo en 1966 (Hubby y Lewontin, 1966 y Lewontin y Hubby, 1966 en *Drosophila pseudoscura* y Harris, 1966 en la especie humana).

La técnica de electroforesis de proteínas ha sido escasamente utilizada en las diferentes especies de cangrejos de río. En el año 1978 encontramos el primer estudio sobre variabilidad enzimática en *Astacus leptodactylus* (Badino y Robotti, 1978), al que seguirán no más de 15 trabajos en diferentes especies de cangrejos de río. Todos ellos evidencian niveles de variabilidad bajos (Nemeth y Tracey, 1979; Brown, 1981; Attard y Pateur, 1984; Attard y Vianet, 1985; Busack, 1988; Agerberg, 1990). Incluso en estudios posteriores, aumentando el número de especies y de loci examinados (Horwitz *et al.*, 1990; Austin, 1996; Fetzner, 1996; Crandall, 1997; Fetzner *et al.*, 1997) la cantidad de variabilidad observada es baja. Los valores de heterocigosis media (H) encontrados son bajos, de entre 0,06-0,08 [incluso hay casos extremadamente bajos como en el género *Cambarus*, de 0,01 (Koppelman y Figg, 1995)] si se comparan con otros invertebrados dulceacuícolas como los cladóceros (entre los que se encuentra la pulga de agua, género *Daphnia*), con valores superiores al 0,10 (Platt y Spitze, 2000).

Sólo cuatro trabajos estudian la variabilidad genética de poblaciones europeas de *Austropotamobius pallipes*. Zarazaga (1993) caracterizó genéticamente, mediante electroforesis de proteínas, tres especies de

cangrejos de río (dos especies alóctonas, *Procambarus clarkii* y *Pacifastacus leniusculus* y la especie autóctona, *Austropotamobius pallipes*) en poblaciones españolas, encontrando en la especie autóctona mayor variabilidad ($H=0,12$) que en las alóctonas. Por otro lado, Lörtscher estudió diversas poblaciones de *A. pallipes* de Suiza (Lörtscher *et al.*, 1997; Lörtscher *et al.*, 1998). Sus resultados revelaron niveles muy bajos de heterocigosis ($H= 0,005$) y un porcentaje de loci polimórficos entre 0 y 10%.

Por último, Santucci (Santucci *et al.*, 1997) analizó, también mediante electroforesis de proteínas, una muestra más amplia de poblaciones de *A. pallipes*, que incluía Francia, Inglaterra, Italia, España y los Balcanes, obteniendo valores bajos de variabilidad genética ($H=0,05$).

Hacia finales de los años 70 y comienzos de los 80 se produjo un desarrollo de nuevas tecnologías basadas en el análisis del ADN que han resuelto los inconvenientes que limitaban la utilidad de la técnica de electroforesis proteica.

Los RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) se basan en la detección, mediante sondas, de fragmentos específicos en el conjunto del ADN de un organismo, digerido con enzimas de restricción, y separando los fragmentos resultantes mediante electroforesis. La técnica de los RFLP es compleja y requiere grandes cantidades de ADN.

Los RFLPs han sido utilizados en poblaciones de *Austropotamobius pallipes* (Grandjean y Souty-Grosset, 1996; Grandjean *et al.*, 2000; Grandjean *et al.*, 1997a, b, 2001) de diferentes países europeos, como Francia, Inglaterra, Eslovenia y España. De estos trabajos se desprende la clasificación propuesta para el género *Austropotamobius* incluyendo cuatro especies, ya comentada con anterioridad. En el último de estos trabajos (Grandjean *et al.*, 2001) en los 154 individuos analizados de la especie *A. pallipes* procedentes de

poblaciones españolas sólo se ha detectado un haplotipo, que coincide con el haplotipo registrado en una población del norte de Italia.

En 1986 aparece una nueva técnica, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que ha supuesto una auténtica revolución en la biología molecular (Mullis *et al.*, 1986). Su éxito radica en que permite la amplificación de fragmentos específicos, hasta concentraciones muy elevadas, a partir de pequeñas cantidades de un ADN molde.

Basada en la PCR se ha desarrollado una metodología que se conoce como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA o ADN polimórfico amplificado al azar) (Williams *et al.*, 1990; Welsh y McClelland, 1990). Esta técnica se basa en la utilización de un cebador de pequeño tamaño, generalmente 10 nucleótidos, y de secuencia arbitraria por lo que no requiere el conocimiento previo del genoma de la especie a estudiar. De esta manera multitud de fragmentos son amplificados con cada grupo de cebadores en cada genoma. La técnica RAPD presenta una serie de ventajas con respecto a otros marcadores moleculares para el estudio poblacional de organismos muy desconocidos genéticamente (Black, 1993):

- no requiere conocimiento previo de la secuencia de ADN,
- es un método rápido, sencillo y con costes inferiores a los de otras técnicas,
- permite analizar un número elevado de muestras en un tiempo reducido,
- se necesitan cantidades mínimas de ADN molde,
- no se utiliza radiactividad,
- y, por último, revela un elevado grado de polimorfismo debido al gran número de loci que permite estudiar, muchos de los cuales se piensa que son no codificantes (Williams *et al.*, 1990).

No obstante, los RAPD tienen también algunos inconvenientes (Black, 1993). En su mayor parte presentan una herencia dominante y, la principal objeción a la que se enfrenta esta técnica, es el problema de la reproducibilidad, por lo que se hace necesaria una estricta estandarización de las condiciones de amplificación, así como llevar a cabo réplicas de todas las amplificaciones para una completa fiabilidad.

Pese a estos inconvenientes, los RAPD constituyen una excelente herramienta para los estudios genéticos de poblaciones. Sólo encontramos un único trabajo en el que se emplea la técnica de RAPD en poblaciones europeas de *Austropotamobius pallipes* (Gouin *et al.*, 2001) encontrando, según los autores, niveles elevados de diversidad ($H_o = 0,159$) basados en el índice de diversidad de Shannon. Existen en la bibliografía otros dos trabajos que también emplean esta técnica de RAPD en poblaciones de cangrejo. Por un lado, en poblaciones australianas de *Cherax quadricarinatus* (Macaranas *et al.*, 1995) que revela niveles de variabilidad genética (polimorfismo=0,12) que se encuentran dentro del rango establecido para el Orden Decapoda (P entre 0,008 y 0,12 según Hedgecock *et al.*, 1980). Y por otro lado, un estudio de Schulz (2000) en el que se observa diferenciación genética entre diversas poblaciones europeas de *Astacus astacus*.

Así pues, a pesar de existir un único estudio que emplea como marcador los RAPD en la especie *A. pallipes*, parece que los niveles detectados de variabilidad genética son elevados si los comparamos con los que se han encontrado utilizando la técnica de electroforesis de isoenzimas y RFLP.

Otra de las técnicas basadas en la PCR que se emplea en estudios poblacionales es la de los microsatélites o repeticiones de secuencias simples (SSRs). El uso de los microsatélites en distintas especies de cangrejos es escaso, sólo tres trabajos publicados (Baker *et al.*, 2000; Belfiore y May, 2000; Gouin *et al.*, 2000). Únicamente uno de ellos (Gouin *et al.*, 2000) hace

referencia a la especie *Austropotamobius pallipes*, con valores de variabilidad basados en heterocigosis (H) que oscilan entre 0 y 0,43.

En 1995 apareció publicada la descripción de una nueva técnica llamada polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) (Vos *et al.*, 1995), que combina características de RAPD y de RFLP. Entre las ventajas que presenta destacan la elevada reproducibilidad, combina la variabilidad detectada por RFLP y RAPD, el número de marcadores que se obtiene mediante esta técnica es muy elevado y no requiere conocimiento previo del genoma. En su contra está el hecho de una mayor complejidad técnica, frente a los RAPD, y un requerimiento de calidad de ADN superior, debido a las exigencias de las enzimas de restricción, además de un mayor coste.

Únicamente hemos encontrado en la bibliografía un trabajo que ha utilizado AFLP para el estudio de la variación de una especie de cangrejo de río, *Orconectes luteus* (Fetzner y Crandall, 1999) en el que los niveles de polimorfismo detectado han sido más elevados que los encontrados en estudios con isoenzimas (de 24% a 65%). Los autores ven necesario, para que el uso de este marcador sea fiable, comprobar la reproducibilidad de los patrones de bandas.

Actualmente se dispone de una considerable cantidad de información acerca de la ecología, comportamiento, anatomía, crecimiento y reproducción de *Austropotamobius pallipes* (Holdich, 2002b). Mientras que la información sobre su genética y morfometría es mucho menor y, a pesar del declive de sus poblaciones, *A. pallipes* todavía es prácticamente desconocido desde el punto de vista genético poblacional. Además, algunos estudios recientes muestran que la mayor cantidad de variabilidad genética de la especie se concentra en los países mediterráneos (Santucci *et al.*, 1997), por lo que se

debe tener especial cuidado en preservarla en nuestro país (Souty-Grosset *et al.*, 1997, 1999).

En definitiva, *A. pallipes* es la única especie autóctona de cangrejo de río en la Península Ibérica. Su distribución y abundancia se han visto mermadas de forma drástica en las últimas décadas. Ha sido catalogada como especie vulnerable en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) e incluida en los Anexos II y V de las Directivas 92/43/CEE y 97/62/UE como especie que requiere medidas especiales de conservación. En la actualización del Catálogo Nacional de especies amenazadas se ha incluido como especie “vulnerable” por su tendencia poblacional regresiva que le ha llevado a desaparecer de una gran parte de su área de distribución (BOE nº 149 de 23 de junio de 2003). Las poblaciones supervivientes de *A. pallipes* están muy fragmentadas, y habitan zonas marginales de su hábitat previo, en los que ocupan tramos muy reducidos. Por ello, además de la actuación de factores de riesgo específicos (afanomicosis, destrucción del hábitat, furtivismo, etc.), su riesgo de extinción por la acción de factores regulados por el azar es muy elevado.

Todo ello evidencia la urgencia en la adquisición de conocimientos morfométricos, y especialmente genéticos, sobre esta especie en nuestro país.

Así pues, en este trabajo nos hemos propuesto la utilización de la metodología RAPD-PCR y marcadores morfométricos para el estudio de la estructura de las poblaciones de cangrejo de río (*Austropotamobius pallipes*) en nuestro país, constituyendo el primer trabajo de esta especie que incluye un número significativo de poblaciones distribuidas en toda España.

1.5 OBJETIVOS

Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones, nos hemos planteado en el presente trabajo un estudio de las poblaciones españolas de cangrejo de río, *Austropotamobius pallipes* con dos objetivos generales. Por un lado, el análisis de la estructura genética mediante la utilización de marcadores moleculares, y por otro lado, el análisis de la estructura morfométrica a través del empleo de diversos marcadores morfométricos.

En el primer caso, para el análisis genético, evaluando ventajas e inconvenientes, se ha elegido la técnica RAPD-PCR (ADN polimórfico amplificado al azar). A sus ventajas técnicas se une el hecho de que numerosos estudios demuestran la utilidad de esta metodología en la detección de la variabilidad y la diferenciación genética tanto dentro como entre poblaciones en muy diversos organismos. Con la puesta a punto pertinente y la adaptación a un tejido, el músculo de pinza, que evitase el sacrificio de los individuos, condición fundamental para el trabajo con una especie como la que nos ocupa, en clara regresión.

En el segundo caso, la obtención de información de hasta quince medidas morfométricas tanto en machos como en hembras, conocer la variabilidad basada en caracteres morfológicos y merísticos ya que en estos momentos se disponen de muy pocos datos sobre las poblaciones españolas de *A. pallipes*.

Mediante esos dos amplios objetivos generales hemos pretendido esclarecer las siguientes cuestiones,

- ¿Cuál es la cantidad de variabilidad genética que mantienen las poblaciones españolas de *A. pallipes*?
- ¿Cuáles son los patrones de distribución de esa variabilidad genética?
- ¿Existe diferenciación genética apreciable entre las poblaciones?

- ¿Se aprecia una relación genético-hidrográfica entre las poblaciones?
- ¿Se observa una relación genético-geográfica entre las poblaciones?
- ¿Cuál es la diferenciación morfométrica sexual?
- ¿Existe diferenciación morfométrica entre las poblaciones?
- ¿Se aprecia una relación morfométrico-hidrográfica entre las poblaciones?
- ¿Se observa una relación morfométrico-geográfica entre las poblaciones?

La información obtenida en este trabajo, utilizando dos tipos distintos de marcadores, moleculares y morfométricos, puede ser de utilidad básica tanto en el conocimiento del estado actual de la especie en nuestro país como en su posible aplicación a la gestión de las poblaciones. Gestión a través de la elaboración de planes de recuperación con el fin de eliminar el riesgo de extinción de la especie, restaurar las poblaciones de la especie autóctona, controlar la expansión de las especies alóctonas de cangrejos, conservar el hábitat y aumentar la vigilancia sobre las poblaciones del cangrejo de río.

Material y Métodos

2 MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Para llevar a cabo el presente trabajo se han analizado doce poblaciones de cangrejo de río, *Austropotamobius pallipes*, once de ellas pertenecen a distintos sistemas acuáticos de la Península Ibérica y una procedente de Italia. Todas las poblaciones españolas son naturales excepto una, cuyos ejemplares (de origen desconocido) se crían en cautividad para posteriores repoblaciones. Se trata de la población de la Astacifactoría de Rillo de Gallo (RIL), en Guadalajara.

La localización exacta de todas estas poblaciones puede verse en los mapas representados en las Figuras 2 y 3. Con las poblaciones españolas se ha pretendido tener muestreada la mayor amplitud geográfica posible de la distribución de la especie en España, aún cuando la planificación ideal de las capturas no pudo lograrse totalmente por causas ajenas a nuestra voluntad.

En la Tabla 3 se muestra el nombre de cada población, el código que se le ha asignado (tres letras), la cuenca y vertiente a la que pertenece, altitud (en metros), localidad y provincia en la que se encuentra y fecha de muestreo.

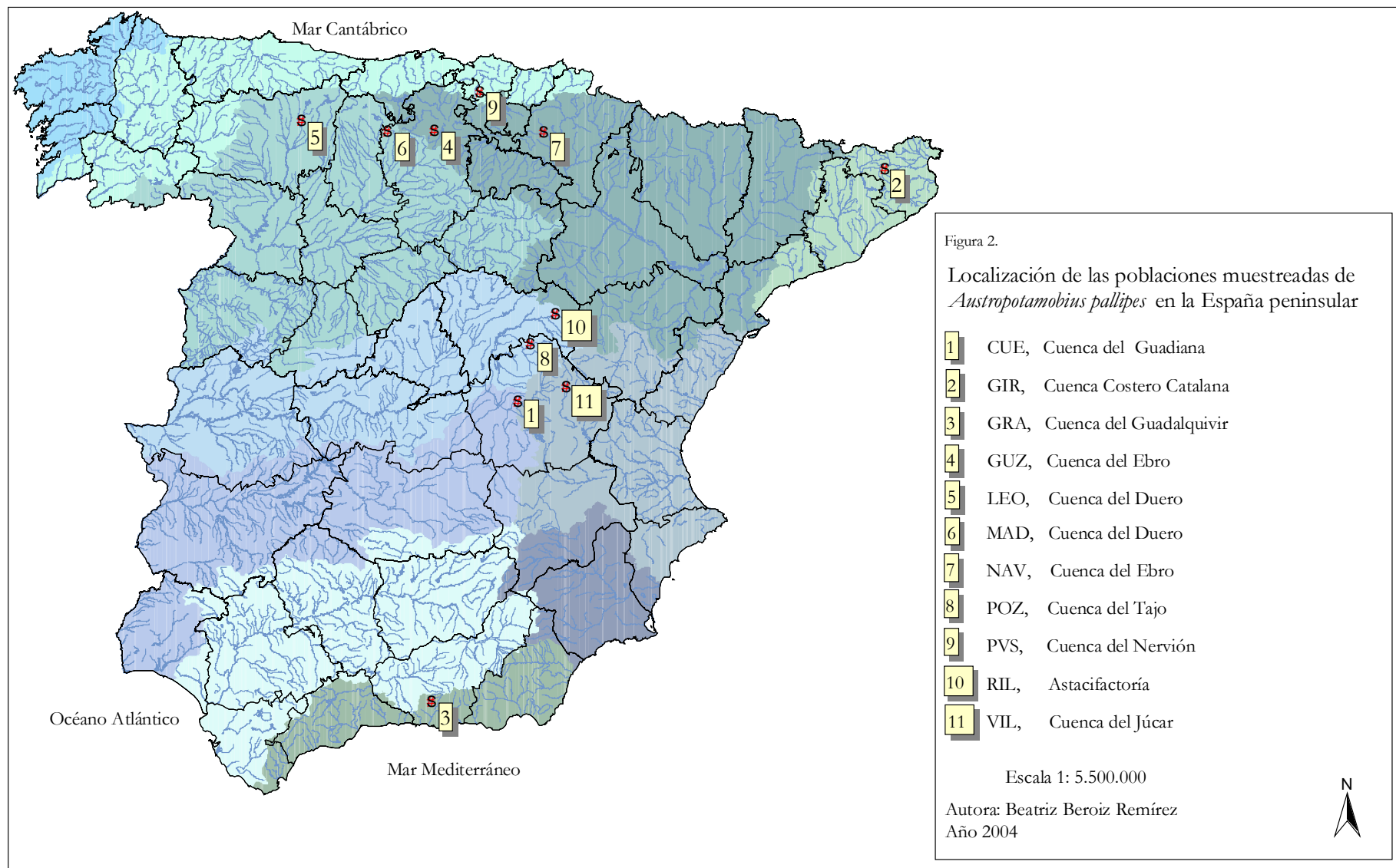


Figura 2. Localización de las poblaciones muestreadas de *Austropotamobius pallipes* en España.



Figura 3. Localización de la población muestreada de *Austropotamobius pallipes* en Italia.

Población	Código	Cuenca	Vertiente	Altitud (m)	Localidad	Provincia	Fecha muestreo
Coscile	COS					Calabria (Italia)	
Arroyo Cuende	CUE	Guadiana	Atlántica	900	Huerta Obispalía	Cuenca	07/09/00
Arroyo Santa Margarida	GIR	Cos. Catalana	Mediterránea	435	Olot	Gerona	19/09/00
Arroyo Ermitas	GRA	Guadalquivir	Atlántica	1.050	Albuñuelas	Granada	05/08/99
Arroyo Guztar	GUZ	Ebro	Mediterránea	800	Padrones de Bureba	Burgos	17/06/99
Laguna Valsemana	LEO	Duero	Atlántica	990	Lugán	León	11/06/99
Manantial Madalena	MAD	Duero	Atlántica	1.180	Rebolledo de Traspesña	Burgos	17/06/99
Río Ega	NAV	Ebro	Mediterránea	480	Estella	Navarra	08/10/98
Arroyo Pozuelo	POZ	Tajo	Atlántica	1200	El Pozuelo	Cuenca	25/07/98
Río Nervión	PVS	Nervión	Atlántica	209	Altuve	Álava	29/08/00
Astacifactoría de Rillo de Gallo	RIL	-	-	1100	Rillo de Gallo	Guadalajara	03/08/98
Río Guadazaón	VIL	Júcar	Mediterránea	830	Valdemoro	Cuenca	19/08/98

Tabla 3. Poblaciones analizadas.

En las diferentes columnas se muestra la denominación de la población, código asignado, cuenca hidrográfica y vertiente a la que pertenece, altitud (en metros), localidad y provincia en la que se encuentra y fecha en la que se recogió la muestra.

La Astacifactoría de Rillo de Gallo mantiene individuos de origen desconocido.

En las Figuras 4, 5 y 6 se pueden observar algunos de los lugares de muestreo: Astacifactoría de Rillo de Gallo (RIL), A. Pozuelo (POZ) y Laguna de Valsemana (LEO).



Figura 4. Detalle de la Astacifactoría de Rillo de Gallo (Guadalajara).



Figura 5. Arroyo Pozuelo (Cuenca).



Figura 6. Laguna de Valsemana (León).

De las poblaciones de la Península Ibérica se disponía del ejemplar completo, aunque no del mismo número de efectivos en cada muestra. Estas diferencias se deben a las grandes dificultades con las que nos hemos encontrado a la hora de conseguir el material biológico para poder llevar a cabo esta investigación, entre las que se encuentra la diferente eficacia de los métodos de muestreo, la densidad de las poblaciones y las características de los diferentes ambientes muestrados. Además, puesto que no es una especie pescable han sido necesarios permisos de las Administraciones de Pesca Fluvial y Conservación de la Naturaleza de las distintas Comunidades Autónomas de las que se pretendían recoger ejemplares.

De la muestra de Italia sólo se disponía del segundo pereiópodo (apéndice abdominal que participa en la locomoción, de aspecto similar al del primer pereiópodo, comúnmente conocido como pinza, pero de menor tamaño) por cada ejemplar. Los pereiópodos fueron enviados por correo ordinario desde el Laboratoire de Génétique et Biologie des Populations de Crustacés de la Universidad de Poitiers por Frédéric Grandjean, conservados en etanol al 70%. Además, de esta última población, no se disponía de la información sobre el sexo de cada individuo.

2.1.1 Captura de los individuos de *Austropotamobius pallipes*

Las técnicas de muestreo de cangrejos de río se encuentran ampliamente desarrolladas. En general, existen tres tipos básicos que son, pesca manual, captura con trampas y pesca eléctrica (Laurent, 1988). Nosotros hemos utilizado los dos primeros, pesca manual y captura con trampas.

El muestreo manual es un procedimiento frecuentemente utilizado, bien realizando las capturas directamente con la mano (Brown y Bowler, 1978), bien apoyándose con redes manuales. La técnica consiste en ascender

la corriente levantando cuidadosamente las piedras del fondo y explorando a la vez los agujeros de los ribazos por entre las raíces de la vegetación, teniendo cuidado de atrapar los animales por el dorso y por detrás de las pinzas. Se emplea en pequeños cursos de agua y en puntos donde las nasas ofrecen resultados negativos debido al pequeño tamaño efectivo de las poblaciones. Nosotros empleamos esta técnica para capturar los individuos de las poblaciones de la Astacifactoría de Rillo de Gallo (RIL), Arroyo de las Ermitas (GRA), Arroyo Santa Margarida (GIR), Arroyo Cuende (CUE), Manatíal de la Madalena (MAD), Arroyo Guztar (GUZ) y Río Nervión (PVS).

El modelo de trampa empleado, en el segundo tipo de muestreo que se llevó a cabo, ha sido una nasa cebada (unas veces con sardina, otras con hígado de cerdo) de doble entrada con un diámetro de entrada de 30 cm y luz de malla de 0.5 cm. En la Figura 7 se puede observar una trampa de este modelo.

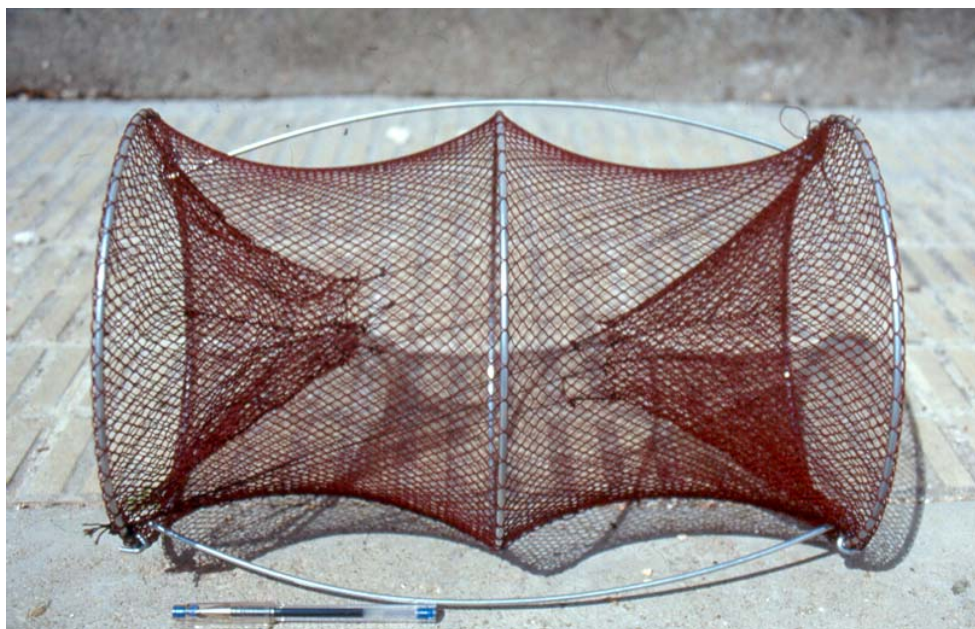


Figura 7. Detalle de la trampa empleada en los muestreos.

Empleamos esta técnica en la Laguna de Valsemana (LEO), Río Guadazaón (VIL), Arroyo Pozuelo (POZ) y Río Ega (NAV). Se trata de una metodología muy eficaz con la que se obtienen datos que permiten comparaciones interpoblacionales muy fiables, a diferencia de los otras dos técnicas, que se encuentran muy condicionados por el esfuerzo y eficacia de muestreo, y éstos a su vez por diversos factores como la estructura y accesibilidad del punto a muestrear y la habilidad de quien realiza la captura. Pero esta técnica de captura con trampas no deja de ser marcadamente selectiva con el tamaño, de modo que solamente se capturan individuos por encima de un determinado tamaño (aproximadamente 4 cm), por lo que el resto de los efectivos de la población no se evalúan. Además, los resultados se encuentran muy condicionados por la fenología de actividad de la especie, que puede experimentar marcadas oscilaciones estacionales y tener sesgos sexuales. Y las trampas pueden ser saboteadas o trastocadas por animales depredadores de los cangrejos, como la nutria *Lutra lutra*. Al finalizar la recogida de los ejemplares las nasas se desinfectaron con una solución de agua y lejía (1:50).

Con ambas técnicas de muestreo los cangrejos que se recogieron fueron los primeros capturados, esto es, no se hizo selección sobre la captura para obtener la muestra definitiva.

En algunos casos, los Agentes Medioambientales fueron los encargados de recoger los ejemplares, como en el caso de las poblaciones de GUZ (A. Guztar) y MAD (M. Madalena), en la provincia de Burgos. En otros casos los Agentes nos acompañaron durante la captura de los cangrejos, como en LEO (L. Valsemana) y GIR (A. Santa Margarida), León y Gerona respectivamente.

2.1.2 Transporte, conservación y mantenimiento de los animales

El transporte de los animales vivos desde su lugar de origen hasta el laboratorio del Departamento de Genética de la Universidad Complutense se realizó en cajas de poliuretano con cuatro bandejas divididas en cuatro partes. En cada bandeja se colocaron diez animales (dependiendo de la cantidad de ejemplares capturados el número era menor) cubiertos con tela de saco húmeda y sobre la que se añadía hielo picado. En el fondo de las cajas, cerradas, se colocaron varios acumuladores, para conseguir un ambiente fresco, húmedo y oscuro. Una vez en el laboratorio los animales se mantuvieron en cámaras frigoríficas a una temperatura de 4 °C hasta el momento de tomar los datos morfométricos y extraer el músculo de la pinza de cada uno de los ejemplares. Con la excepción, como se ha mencionado anteriormente, de la muestra italiana, cuyos pereiópodos fueron enviados conservados en etanol al 70%.

2.1.3 Material para el análisis genético

Se ha analizado la variabilidad genética de 25 individuos de cada una de las once poblaciones españolas y 10 individuos de la muestra italiana, en total 285 individuos. En la Tabla 4 se muestra el número de machos y hembras para cada una de ellas.

Población	Código	Número Total	Número Machos	Número Hembras
Coscile (Italia)	COS	10	*	*
Arroyo Cuende	CUE	25	16	9
Arroyo Santa Margarida	GIR	25	14	11
Arroyo Ermitas	GRA	25	12	13
Arroyo Guztar	GUZ	25	17	8
Laguna Valsemana	LEO	25	16	9
Manantial Madalena	MAD	25	24	1
Río Ega	NAV	25	9	16
Arroyo Pozuelo	POZ	25	17	8
Río Nervión	PVS	25	11	14
Astacifactoría de Rillo de Gallo	RIL	25	14	11
Río Guadazaón	VIL	25	13	12

Tabla 4. Número total de individuos utilizados en el análisis genético de las doce poblaciones, españolas e italiana, de *A. pallipes*, y sexo de los mismos.

(*): Se desconoce el sexo de los ejemplares de la población de Coscile (COS)

2.1.4 Material para el análisis morfométrico

En esta parte del estudio se han analizado *in vivo* 435 individuos pertenecientes a las once poblaciones españolas mencionadas en el apartado anterior. De la muestra de Italia no se pudo llevar a cabo el estudio morfométrico puesto que, como se ha comentado al comienzo de este apartado, sólo se disponía de un pereiópodo de cada individuo.

A continuación se enumera cada una de las poblaciones y se indica el número exacto de individuos, así como su sexo, empleados para la recogida de los datos morfométricos. El número de ejemplares, como puede verse en la Tabla 5, no es el mismo en todas las poblaciones. De la población del R. Ega (NAV) es de la que menos ejemplares se pudieron conseguir, sólo 27, mientras que de la Astacifactoría de Rillo de Gallo (RIL) y del R. Nervión (PVS) se consiguieron 42 y 48 respectivamente.

Población	Nº total	Nº machos	Nº hembras	%machos	% hembras	Sex ratio
Cue	40	24	16	60,0	40,0	1,50
Gir	40	18	22	45,0	55,0	0,81
Gra	41	16	25	39,0	61,0	0,64
Guz	40	25	15	62,5	37,5	1,67
Leo	41	20	21	48,7	51,2	0,95
Mad	40	39	1	97,5	2,50	39,0
Nav	27	11	16	40,7	59,2	0,68
Poz	41	25	16	60,9	39,0	1,56
Pvs	48	28	20	58,3	41,6	1,40
Ril	42	25	17	59,5	40,4	1,47
Vil	35	17	18	48,5	51,4	0,95
Total	435	248	187	57,0	42,9	1,32

Tabla 5. Número y porcentaje de machos y hembras en las once poblaciones de *A. pallipes* utilizados en el análisis morfométrico.

En la última columna aparece la proporción de sexos (sex-ratio) de cada población y el total.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Extracción de ADN

Como fuente de ADN para la posterior amplificación con la técnica RAPD-PCR se seleccionó el músculo de pinza, órgano que los cangrejos de río regeneran tras su amputación. De esta manera se ha pretendido utilizar un tejido que pudiera, en estudios posteriores, evitar el sacrificio de los ejemplares, aun causando en este estudio la muerte de los individuos porque se requería disponer de los ejemplares hasta finalizar la investigación.

Primero se diseccionó la pinza y posteriormente se sacrificó al animal mediante congelación en nitrógeno líquido y posterior almacenamiento a una temperatura de -80°C .

El aislamiento y purificación de ADN genómico se llevó a cabo según el método de Benito y cols. (1993), con modificaciones.

Se tomaban 50 mg de músculo, se homogeneizaban en 500 μl de tampón de extracción (Tris-HCl 100mM pH 8,0, EDTA 50mM pH 8,0 y NaCl 500mM) y se sometía a un tratamiento con 35 μl de SDS al 20% a 65°C durante 30 minutos, para romper las membranas celulares. Posteriormente se añadían 175 μl de acetato potásico 5M y la mezcla se incubaba a -20°C durante 15 minutos; el SDS, junto con el acetato potásico, precipitan los polisacáridos y las proteínas a bajas temperaturas. Tras centrifugar durante 15 minutos a 14000 rpm se recogía el sobrenadante y se mezclaba con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) para eliminar contaminantes de tipo proteico. Tras una centrifugación de 5 minutos a 13000 rpm se separan las fases y se recoge la fase acuosa, repitiéndose la extracción fenólica cuatro veces (en algunos casos hasta cinco). Para eliminar restos de fenol de la fase acuosa se añadía un volumen de cloroformo y se recuperaba

de nuevo la fase acuosa a la que se añadía un volumen de isopropanol para precipitar el ADN. Esta mezcla se mantenía toda la noche a -20°C .

Después de una centrifugación de 20 minutos a 13000 rpm se recuperaba el ADN en forma de precipitado y se lavaba con 800 μl de etanol al 70% para eliminar las sales. Se centrifugaba durante 5 minutos a 13000 rpm, se eliminaba el sobrenadante y el precipitado obtenido se dejaba secar al aire. Tras este paso se resuspendía en 300 μl de TE 10:1 (Tris-HCl 10mM pH 8,0 y EDTA 1mM pH 8,0). El ADN resuspendido se incubaba con 2 μl de RNAsa A+T₁ (10 mg/ml A, 10U/ μl T₁) durante 30 minutos a 37°C para que actuara la RNAsa. Después la solución se lavaba dos veces con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, y una tercera con un volumen de cloroformo. Tras recuperar la fase acuosa se le añadían 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 5,2 y un volumen de isopropanol para precipitar el ADN. La mezcla se mantenía a -20°C durante toda la noche y el ADN se conservaba de esta forma hasta su utilización.

A la hora de utilizar el ADN se centrifugaba durante 10 minutos a 13000 rpm y el ADN precipitado se lavaba con ETOH al 70%, igual a como se ha explicado anteriormente y, una vez seco, se resuspendía en 150 μl de TE 10:1.

Todas las centrifugaciones que se realizaron durante el proceso de extracción se hicieron a 4°C . Todos los reactivos empleados durante el proceso de extracción se prepararon según Sambroock y cols. (1989).

Para determinar la concentración de ADN se medía la densidad óptica a 260 nm, siguiendo el método espectrofotométrico de Sambroock y cols. (1989). Se obtenía la pureza del ADN mediante la relación de la densidad óptica a 260 y 280 nm de longitud de onda; si se obtenía un valor entre 1,8-2,0 era indicativo de pureza, si el valor era inferior indicaba contaminación con proteínas o con restos de fenol y en esos casos la muestra se volvía a purificar. También se realizaba una electroforesis del ADN en un gel de

agarosa al 1% con tampón TAE (Tris- acetato 0,04 M, EDTA 1mM pH 8,0) y bromuro de etidio (1µg/ml) (Sambroock *et al.*, 1989) para comprobar que no existía degradación del ADN ni restos de ARN (Figura 8).

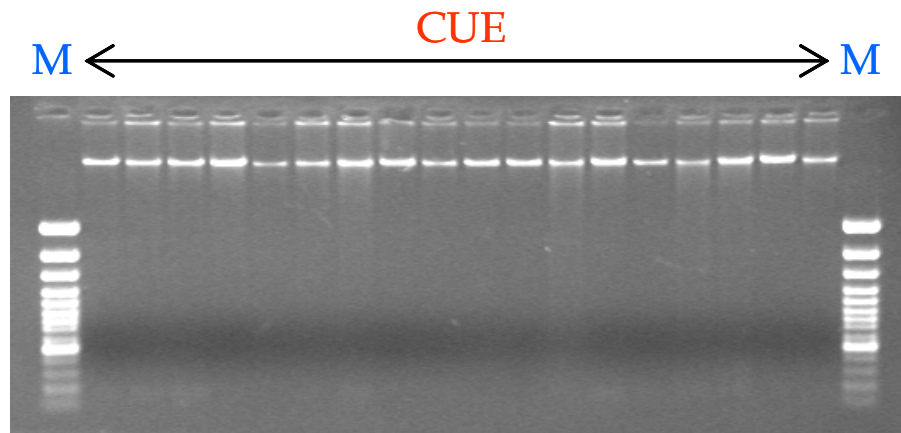


Figura 8. ADN genómico perteneciente a 18 individuos de *A. pallipes* de la población de Arroyo Cuende (CUE) en un gel de agarosa al 0,8%.

En los extremos se muestra el marcador de peso molecular de 100 pb (M).

Una vez valorado el ADN se llevaba a una concentración de 5ng/µl con TE 10:1 y se conservaba a 4°C mientras se utilizaba para las diferentes amplificaciones. La conservación a esta temperatura fue para evitar roturas en el ADN en caso de haberlo sometido a varios procesos de congelación y descongelación.

2.2.2 Amplificación de ADN mediante RAPD-PCR

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo siguiendo el protocolo de Williams y cols. (1990) con algunas modificaciones. Como cebadores se utilizaron 10 oligodecámeros de las series A y C de Operon (Operon Technologies, Inc.), cuya secuencia aparece en la Tabla 6. En las poblaciones españolas se emplearon los diez oligodecámeros, mientras que

en la población de Coscile (COS) sólo fue posible la utilización de tres de ellos (OPA01, OPA06, OPA12).

Oligodecámero	5'→3'
OPA01	CAGGCCCTTC
OPA06	GGTCCCTGAC
OPA11	CAATCGCCGT
OPA12	TCGGCGATAG
OPC04	CCGCATCTAC
OPC06	GAACGGACTC
OPC07	GTCCCGACGA
OPC14	TGCGTGCTTG
OPC15	GACGGATCAG
OPC16	CACACTCCAG

Tabla 6. Secuencia de los oligodecámeros de las series A y C (Operon Technologies, Inc.) utilizados en la amplificación del ADN de *A. pallipes* mediante RAPD-PCR.

El volumen final de la mezcla de reacción era de 12,5 µl y contenía:

- 12,5 ng de ADN molde o genómico,
- 1,25 µl de tampón de reacción Stoffel 10X (Applied Biosystems) // Tris-HCl 10 mM y KCl 10 mM a pH 8,3,
- MgCl₂ 4mM,
- 100 µM de cada uno de los cuatro desoxirribonucleótidos,
- 5 picomoles del cebador correspondiente,
- y 1,25 unidades de la Taq ADN polimerasa (fragmento Stoffel, Applied Biosystems).

Una vez añadido el ADN a la mezcla de reacción ésta se cubría con una gota de aceite mineral y se introducía en un termociclador. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador programable Peltier PTC-100 (MJ Research) y el programa empleado para la amplificación era el siguiente:

- 1 ciclo de desnaturalización de 6 minutos a 94 °C
- 55 ciclos de amplificación con cuatro pasos cada uno:
 - desnaturalización a 94°C, 1 minuto
 - anillamiento a 36°C durante 1 minuto
 - rampa de incremento de temperatura hasta 72 °C, desde el anillamiento a la polimerización, de 0,4°C/seg
 - polimerización a 72°C, 4 minutos
- 1 ciclo de terminación a 72°C de 6 minutos

La separación y tinción de los productos de amplificación se realizaba por electroforesis en geles de agarosa al 2% con tampón TAE (Tris-acetato 0,04M, EDTA 1mM pH 8,0) y bromuro de etidio (1µg/µl) (Sambrook *et al.*, 1989). Los productos amplificados se visualizaban en un transiluminador de luz ultravioleta y los geles eran fotografiados empleando película Polaroid 665 con negativo.

Los tamaños de los fragmentos de ADN amplificados se calculaban en función de la comigración de un marcador de peso molecular de escalera de 100 pb (Ready-Load™ 100bp DNA Ladder, Life Technologies) mediante el programa Multi-Analyst Ver 1.1 (Bio-Rad Laboratorios, Inc. 1997).

Todas las amplificaciones se repitieron, al menos, una vez para constatar que los patrones de RAPD obtenidos eran reproducibles. En todas ellas se emplearon dos controles. Un control positivo, que en nuestro caso era

un individuo de la población de la Astacifactoría de Rillo, y un control negativo.

2.2.3 Metodología del análisis morfométrico

Para la recogida de los datos de peso se utilizó una balanza Precisa 600C con una precisión de 0,01 g y para la toma de las medidas de longitud un calibre Vernier con una precisión de 0,05 mm. Las medidas que se tomaron aparecen, junto con el código asignado a cada una de ellas, en la Tabla 7 y en la Figura 9. Estas medidas se refieren tanto a longitud y anchura totales de los individuos, como de cefalotórax, rostro, pinzas y número de espinas, cervicales y del tercer maxilípodo.

Código	Variable
LCF	Longitud de cefalotórax (mm)
LT	Longitud total (mm)
ACF	Anchura de cefalotórax (mm)
Lros	Longitud del rostro (mm)
ABASROS	Anchura de la base del rostro (mm)
ILPINZA	Longitud máxima de la pinza izquierda (mm)
DLPINZA	Longitud máxima de la pinza derecha (mm)
IAPINZA	Anchura máxima de la pinza izquierda (mm)
DAPINZA	Anchura máxima de la pinza derecha (mm)
IESP3MAX	Número de espinas del tercer maxilípodo izquierdo
DESP3MAX	Número de espinas del tercer maxilípodo derecho
IESPCER	Número de espinas cervicales del lado izquierdo
DESPCER	Número de espinas cervicales del lado derecho
SEXO	Sexo (macho: 1, hembra: 0)
PESO	Peso (g)
ML2P	Morfología del lóbulo del segundo pleópodo (simétrico o asimétrico)

Tabla 7. Medidas morfométricas analizadas en los individuos de *A. pallipes* estudiados.

Ciertos ejemplares capturados no presentaban alguna de sus pinzas como se puede ver más adelante en el Anexo 4 al que se hace referencia en el apartado de los resultados.

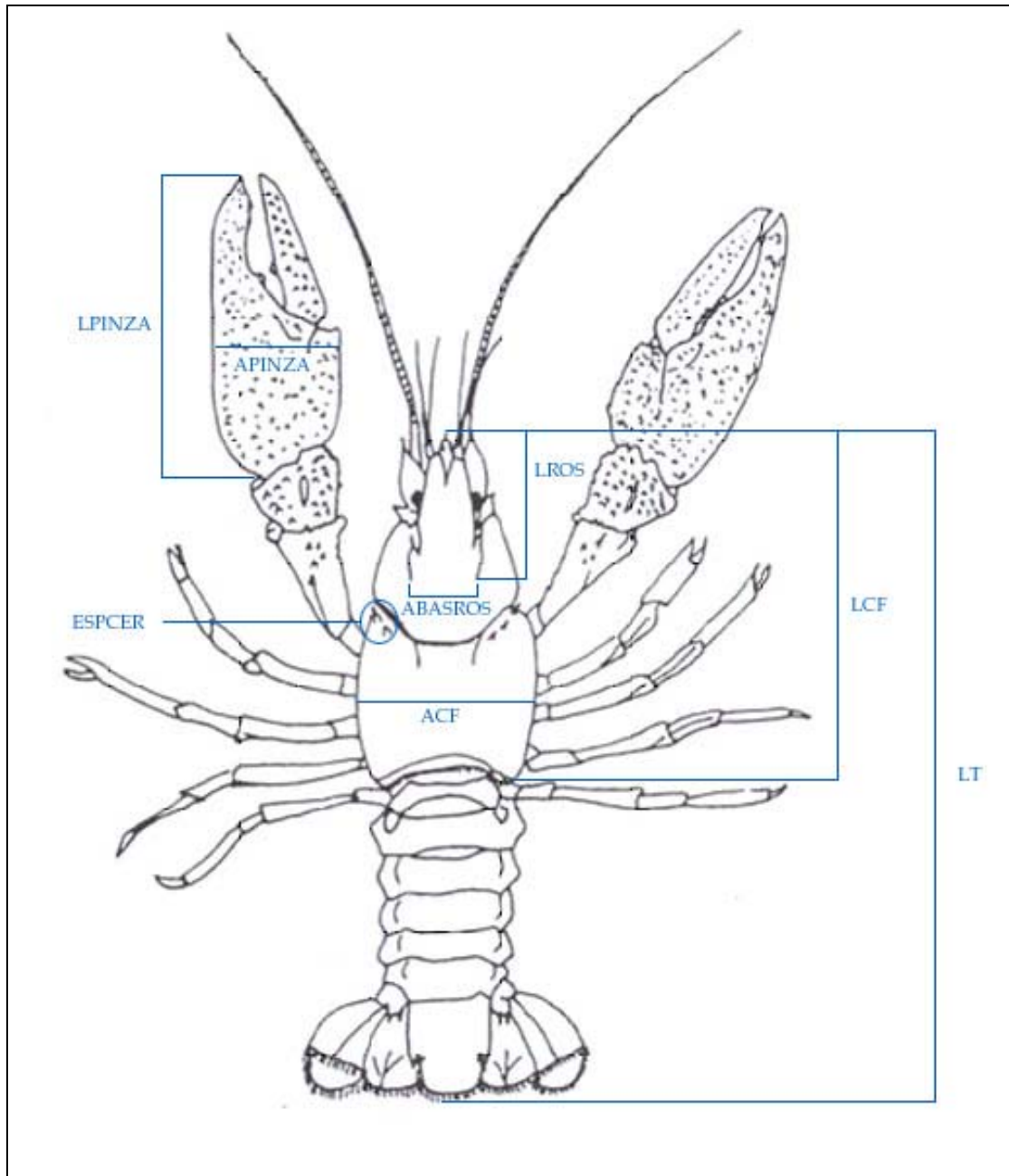


Figura 9. Medidas morfométricas realizadas en los individuos de *A. pallipes*.

2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

2.3.1 Análisis estadístico de RAPD

En primer lugar se han analizado los datos de las once poblaciones españolas en las que han utilizado diez cebadores y, a continuación, estas mismas poblaciones junto con la de Italia, considerando sólo los mismos tres cebadores empleados para esta población italiana.

Para hacer este análisis se observó el patrón de bandas de cada uno de los individuos, determinándose la presencia o ausencia de bandas, tomándose como valor 1 la presencia de una banda y como 0 su ausencia. De esta manera se construyeron dos matrices, una de 133 bandas diferentes obtenidas por medio de RAPD-PCR utilizando 10 cebadores en 275 individuos de *Austropotamobius pallipes*, pertenecientes a once poblaciones españolas (matriz de 133 por 275) y otra al analizar los 285 individuos de *A. pallipes* pertenecientes a once poblaciones españolas y una italiana utilizando tres cebadores (matriz de 50 por 285).

Las bandas obtenidas por medio de la técnica RAPD-PCR se analizaron como marcadores genéticos suponiendo que cumplen las siguientes condiciones:

- se trata de marcadores dominantes que segregan de forma mendeliana,
- las frecuencias genotípicas de los alelos guardan las proporciones de Hardy-Weinberg,
- todos los alelos recesivos ("ausencia de banda") son idénticos en estado (es decir, provienen de mutaciones idénticas); lo mismo ocurre con los alelos dominantes ("presencia de banda").

2.3.1.1 Polimorfismo

De cada una de las bandas se calcularon las frecuencias en cada una de las poblaciones estudiadas.

Uno de los análisis llevados a cabo ha sido el cálculo del polimorfismo (P) o porcentaje de loci polimórficos, considerando cada una de las bandas un locus. El polimorfismo de una población se calcula de la siguiente manera:

$$P = \text{número de loci polimórficos} / \text{número total de loci}$$

La barrera que se establece para considerar a un locus como polimórfico se basa en el criterio del 95% (0,95) que considera a un locus como polimórfico cuando la frecuencia del alelo más frecuente en la población es menor o igual a 0,95. El valor de P varía entre 0, cuando ninguno de los loci es polimórfico, y 1, cuando todos los loci son polimórficos.

2.3.1.2 Análisis de Ji-cuadrado

A partir de las matrices de presencia-ausencia de bandas (133 bandas por 275 individuos; 50 bandas por 285 individuos) se realizó un análisis de Ji-cuadrado para ver si existían diferencias estadísticamente significativas respecto a la frecuencia de las bandas en las distintas poblaciones. Así mismo se hizo un test de diferencias estandarizadas (observadas-esperadas) con la frecuencia de las bandas en cada una de las poblaciones. Estas diferencias se distribuyen como una normal (0,1), así que los valores por encima de 3 indicarían que la frecuencia de la banda estudiada en esa población sería alta, comparada con la frecuencia esperada en la hipótesis de independencia. En otros términos, un valor superior a 3 correspondería a frecuencias de presencia de esa banda en esa población, significativamente superiores a la

frecuencia en el total de poblaciones. Y valores por debajo de - 3 indicarían que la frecuencia de la banda estudiada sería estadísticamente inferior al conjunto.

2.3.1.3 Índice de diversidad

Para conocer el grado de diversidad genética se utilizó el índice de Shannon (Lewontin, 1972), que se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$H_o = - \sum_{i=1}^n p_i \log_2 p_i$$

donde p_i es la frecuencia de un determinado fragmento de RAPD.

H_o se calculó a dos niveles: la diversidad media dentro de poblaciones (H_{pop}), y la diversidad total (H_{sp}). Después, la proporción de diversidad dentro de poblaciones se estimó como:

$$H_{pop}/H_{sp},$$

y la proporción de diversidad entre poblaciones como:

$$(H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}$$

2.3.1.4 Índice de similitud

A partir de la matriz de presencia-ausencia de bandas se calculó el índice de similitud entre los distintos individuos (Simple Matching coefficient, Sokal y Michener, 1958) con el paquete estadístico NTSYSpc versión 2.01b (Applied Biostatistics Inc., 1997), mediante la siguiente fórmula:

$$S_{xy} = n_{xy}/n_x+n_y$$

donde, n_{xy} es el número de bandas comunes, tanto de presencias como ausencias, entre los individuos x e y . Y n_x y n_y son el número de bandas totales presentes en los individuos x e y , respectivamente.

Los datos de similitud intrapoblacional se calcularon promediando los coeficientes de similitud entre los individuos de cada población. Los datos de similitud interpoblacional se calcularon promediando los coeficientes de similitud entre los individuos de una población y los individuos de la población con la cual se compara.

2.3.1.5 Distancias genéticas

La distancia genética es un estadístico que mide la divergencia genética entre dos taxones. Comúnmente se ha utilizado el propuesto por Nei (D) que es una medida aproximada del número medio de sustituciones alélicas por locus y toma valores entre 0, cuando no hay divergencia e infinito. Para calcular las distancias genéticas de Nei se utilizó el programa RAPDDIST, del paquete RAPD-PCR (Black, 1995).

La ecuación es la siguiente:

$$D_{xy} = -\ln [J_{xy} / (J_x J_y)^{1/2}]$$

donde:

$$J_x = \sum_{k=1}^n j_{xk} / n$$

$$J_y = \sum_{k=1}^n j_{yk} / n$$

$$J_{xy} = \sum_{k=1}^n j_{xy} / n$$

para:

$$j_x = \sum_{k=1}^n x_i^2$$

$$j_y = \sum_{k=1}^n y_i^2$$

$$j_{xy} = \sum_{k=1}^n x_i y_i$$

siendo x_i e y_i las frecuencias del alelo i en las poblaciones X e Y respectivamente y n el número de loci analizados.

2.3.1.6 Cálculo de F_{ST} y Nm

El índice de subdivisión de la población (F_{ST}) fue formulado por Wright (1951) como una forma de estimar la correlación entre gametos escogidos al azar dentro de una muestra relativa a la correlación entre gametos escogidos al azar en el conjunto de todas las muestras. Cuando las poblaciones están aisladas, F_{ST} es mayor que cero, debido a que la probabilidad de que gametos escogidos al azar porten alelos derivados de un antepasado común es mayor dentro de una determinada población que en el conjunto de poblaciones.

A partir de los métodos de Weir y Cockerman (1984) y Lynch y Milligan (1994) también se puede estimar este estadístico. La corrección de ambos tiene en cuenta el carácter dominante de los productos de amplificación obtenidos por medio de RAPD-PCR y el relativo pequeño tamaño de las muestras.

Por medio del programa RAPD F_{ST} , del paquete de programas RAPD-PCR (Black, 1995), y utilizando la matriz de presencia-ausencia de bandas, se estimó el coeficiente F_{ST} .

Por otro lado se calculó la tasa efectiva de migración (Nm), que es una medida del flujo génico entre poblaciones y que se estima a partir del coeficiente F_{ST} :

$$F_{ST} = 1 / (1 + 4 Nm)$$

donde m es la tasa media de migración en un modelo de población subdividida y N el tamaño poblacional local (Wright, 1931).

A pesar de que *A. pallipes* es una especie que por sí sola tiene capacidad de migración limitada, los movimientos de individuos de cangrejo de río por parte del hombre de unos cursos de agua a otros, han sido una práctica habitual, aunque no documentada. De esta práctica surge la necesidad de estimar la tasa efectiva de migración (Nm), que podría explicar la diferenciación o falta de ella, entre poblaciones.

2.3.1.7 Análisis de la varianza molecular (AMOVA)

El análisis de la varianza molecular (AMOVA) se realizó con el programa Arlequín 2000 (Schneider *et al.*, 2000). A partir de la matriz de presencia/ausencia de bandas se construyó una matriz de distancias en la que se comparan dos a dos todos los fenotipos. La distancia se calculó como el número de bandas no compartidas por los dos fenotipos, lo que equivale a una distancia euclidiana al cuadrado (δ^2_{ij}). Se utiliza la matriz de distancias para realizar un análisis de varianza de los fenotipos obtenidos extrayendo sus diferentes componentes: varianza de las distancias existentes entre los individuos de una misma población, entre los individuos de diferentes poblaciones pertenecientes a un mismo grupo y entre los individuos de poblaciones pertenecientes a diferentes grupos.

El diseño del análisis se muestra en la Tabla 8. Cada media de desviaciones al cuadrado es igual a la correspondiente suma de desviaciones

al cuadrado (SSD) dividida por los grados de libertad. En cada caso el valor de SSD se expresa como una función de las distancias fenotípicas entre los individuos que se estén analizando. Por ejemplo:

$$SSD_{(t)} = \frac{1}{4} \sum_{j=1}^n \sum_{k=1}^n \delta_{jk}^2$$

donde δ_{jk}^2 es la distancia calculada entre los individuos j y k de la muestra.

Los niveles de significación de las estimas de los componentes de la varianza se calculan por procedimientos permutacionales no paramétricos (en este caso por medio de 10.000 permutaciones al azar).

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de las desviaciones al cuadrado	Media de las desviaciones esperadas al cuadrado
Entre grupos	G-1	MSD _(a)	$n''\sigma_a^2 + n'\sigma_b^2 + \sigma_c^2$
Entre poblaciones dentro de grupos	P-G	MSD _(b)	$n\sigma_b^2 + \sigma_c^2$
Dentro de poblaciones	N-P	MSD _(c)	σ_c^2
Total	N-1	MSD _(t)	σ_T^2

Tabla 8. Diseño del análisis de la varianza molecular (AMOVA).

G: número de grupos

P: número de poblaciones

N: número de individuos

n'' , n' y n : tamaños muestrales de cada uno de los niveles jerárquicos

2.3.1.8 Test de Mantel

La matriz de distancias genéticas de Nei (apartado 1.3.1.4) se comparó con la matriz de distancias geográficas empleando el test de Mantel (1967). Este test mide el grado de relación, Z , entre las dos matrices, siendo:

$$Z = \sum_{ij}^n X_{ij} Y_{ij}$$

donde X_{ij} e Y_{ij} son los elementos de las matrices X e Y . Si las dos matrices contienen valores de distancia similares, Z es mayor de lo que se esperaría por azar.

El test de significación generalmente se lleva a cabo comparando el valor de Z con su distribución permutacional, es decir, la distribución que se obtiene si se compara una matriz (por ejemplo X) con todas las posibles matrices en las que el orden de los elementos de la otra matriz (Y) se han permutado. En la práctica, el número de permutaciones posibles es tan elevado que sólo se utiliza una muestra al azar de las posibles permutaciones (en nuestro caso 10.000).

El test de Mantel se realizó utilizando el paquete estadístico NTSYSpc versión 2.01b (Applied Biostatistics Inc., 1997).

2.3.1.9 Análisis de componentes principales

A partir de la matriz de distancias genéticas de Nei se ha realizado un análisis de componentes principales para determinar las principales tendencias de variación de las poblaciones.

Para llevar a cabo este análisis se empleó el paquete de programas NTSYS 1.60 (Applied Biostatistics Inc., 1990) y NTSYSpc versión 2.01B (Applied Biostatistics Inc., 1997).

El análisis de componentes principales es un método para la extracción del espacio factorial. A partir de la representación de los n individuos como n puntos en un espacio p -dimensional, se extraerá un nuevo espacio p -dimensional de tal forma que:

- El primer eje o factor, F_1 , del nuevo espacio será aquel tal que, de todas las posibles proyecciones de la nube de puntos sobre un único eje, la mínima deformación sea la obtenida con F_1 .
- El segundo F_2 , será aquel tal que de todas las posibles proyecciones de la nube de puntos sobre un espacio de dos dimensiones generado por el eje F_1 y un segundo eje perpendicular a él, la mínima deformación sea la obtenida con F_2 .
- El s -ésimo eje, F_s será aquel tal que, de todas las posibles proyecciones de la nube de puntos sobre un espacio de s dimensiones generado por los ejes F_1, \dots, F_{s-1} y un s -ésimo eje perpendicular a todos los $s-1$ anteriores, la mínima deformación sea la obtenida con F_s .

Por el criterio de extracción de factores, al proyectar la nube de puntos sobre el primer factor su deformación es menor que la obtenida sobre cualquier otro factor. Esto significa que el primer factor es aquel en el que mejor se proyecta la variabilidad de la muestra. El segundo mejor es el segundo eje y así sucesivamente, hasta el último.

El objetivo que se persigue con la perpendicularidad de los factores es pasar de un conjunto de p variables correlacionadas entre sí a un nuevo conjunto de p variables, combinaciones lineales de las originales, que no estén correlacionadas.

La parte de variabilidad total explicada por un factor viene dada por un autovalor correspondiente (tabla de autovalores). Las proyecciones de cada una de las poblaciones sobre cada uno de los k primeros factores, denominadas saturaciones, se disponen en una matriz factorial, la matriz de componentes. El cuadrado de la saturación sobre un factor puede ser

considerado como una medida de la calidad de representación de la variable sobre dicho factor. La saturación de una variable sobre un factor toma valores entre -1 y +1, por este método de componentes principales.

2.3.1.10 Construcción de dendrogramas

Los valores de índices de similitud interpoblacionales se emplearon para la construcción de un dendrograma, aplicando el método de agrupamiento UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average) (Sneath y Sokal, 1973) con el programa NTSYSpc (Rohlf, 1990).

La matriz de distancias genéticas de Nei también se utilizó para construir dos dendrogramas por los métodos de agrupamiento del vecino más próximo (NJ) y UPGMA. Para su elaboración se empleó el programa PHYLIP versión 3.6a2 (Felsenstein, 2001).

El método del vecino más próximo (NJ) se basa en encontrar pares de OTUs (Operational Taxonomic Units, es decir, unidades taxonómicas operativas) que minimicen la longitud total de las ramas del árbol en cada paso del agrupamiento, partiendo de un árbol en forma de estrella. Las estimas de las longitudes de las ramas se obtienen por el método de los mínimos cuadrados. Los datos se suministran al programa en forma de matriz de distancias. Los estudios de simulación muestran que se trata de un método muy eficiente. Probablemente esto se deba a que en cada paso se aplica el criterio de mínima evolución, o máxima parsimonia, y la aplicación de este principio reduce los efectos del error de muestreo.

El método UPGMA se lleva a cabo siguiendo los siguientes pasos:

- Dada una matriz de distancias, se encuentran las dos OTUs i y j entre las cuales existe la menor distancia d_{ij} .
- La longitud de las ramas se calcula como $d_{ij}/2$.

- Si no queda ninguna OTU por agrupar el árbol está completo, en caso contrario se crea un nuevo grupo al que llamaremos u .
- Se define la distancia entre u y cualquier otro OTU (k con $k \neq i$ o j) como la media de las distancias d_{ki} y d_{kj} .
- Se vuelven a repetir todos los pasos, teniendo en cuenta que hemos eliminado las OTUs i y j y hemos añadido el grupo u , de modo que ahora la matriz de dimensión $n \times n$ pasa a ser $(n-1) \times (n-1)$.

La longitud de las ramas de estos dendrogramas es proporcional a la distancia genética existente entre las dos OTUs. Se ha observado que este método se comporta muy bien en estudios de simulación. Parece ser que esto se debe al hecho de que las estimas de distancia genética están sujetas a grandes errores estocásticos y el procedimiento de promediar las distancias utilizado en el UPGMA reduce el efecto de este error en las estimas de la longitud de las ramas. Esto sugiere que si la distancia genética está sujeta a un elevado error estocástico, pero se espera que sea aproximadamente lineal en el tiempo, el UPGMA es un buen método para construir árboles.

En ambos tipos de árboles (UPGMA y NJ) se llevó a cabo un análisis de *bootstrap* (1000 réplicas) para comprobar la fiabilidad de los agrupamientos obtenidos.

2.3.2 Análisis estadístico de datos morfométricos

2.3.2.1 Análisis descriptivo

Se ha llevado a cabo un análisis descriptivo de cada una de las variables morfométricas a través de una serie de estadísticos que permiten analizar la tendencia central y la dispersión de los valores de cada variable:

media, mediana, moda, desviación típica, varianza, asimetría, curtosis, máximo y mínimo.

2.3.2.2 Estudio descriptivo de normalidad

Se ha realizado un estudio descriptivo de normalidad de cada una de las variables morfométricas. Si una variable tiene la forma de una distribución Normal (0,1), tanto el coeficiente de curtosis como el de asimetría deben ser próximos a cero. En caso de que la variable cumpla el requisito de normalidad se pueden emplear métodos paramétricos para análisis posteriores. En caso contrario se pueden emplear análisis no paramétricos o transformar los datos con el fin de cumplir los tres supuestos básicos para la aplicación de pruebas paramétricas: homogeneidad de varianzas (homocedasticidad), normalidad e independencia de los datos.

2.3.2.3 Transformación logarítmica de los datos

Las transformaciones que podemos hacer para conseguir la normalización de los datos son las estándar que incluyen la transformación logarítmica, raíz cuadrada, arcoseno y recíproca, o la transformación general conocida como transformación de Box-Cox.

La transformación que hemos utilizado es la transformación logarítmica que convierte una distribución de frecuencia sesgada positivamente en una simétrica, puesto que es la que mejor se ajusta a nuestros datos:

$$X' = \log (X+1)$$

En todas las variables se ha aplicado esta transformación puesto que es necesaria para los análisis estadísticos posteriores.

2.3.2.4 Test t de Student

El objetivo de la prueba t de Student es determinar si la diferencia entre las medias de una variable en dos grupos distintos de individuos es estadísticamente significativa.

En nuestro caso se ha utilizado esta prueba estadística para comparar el comportamiento entre ambos sexos, hembras y machos, de aquellas variables que cumplan los requisitos de normalidad e igualdad de varianzas.

La hipótesis que se desea contrastar, hipótesis nula (H_0), establece que no hay diferencias en el comportamiento de la variable entre ambos sexos. Si el p -valor asociado al estadístico de contraste es menor que α , se rechazará la hipótesis nula al nivel de significación α .

2.3.2.5 Prueba de Mann-Whitney

El objetivo de la prueba de Mann-Whitney es determinar si la diferencia entre el número de veces en que el valor de la variable en un grupo es mayor que en el otro y el número de veces en que es menor es estadísticamente significativa.

Esta prueba no paramétrica nos permite comparar el comportamiento entre ambos sexos de aquellas variables que no cumplan el requisito de normalidad.

La hipótesis que se desea contrastar, hipótesis nula (H_0), establece que no hay diferencias en el comportamiento de la variable entre ambos sexos. Si el p -valor asociado al estadístico de contraste es menor que α , se rechazará la hipótesis nula al nivel de significación α .

2.3.2.6 Análisis MLG univariante

El análisis MLG univariante (análisis modelo lineal general univariante) o ANCOVA (análisis de la covarianza) se llevó a cabo con el objetivo de controlar los efectos del tamaño corporal sobre los rasgos morfométricos.

El análisis MLG univariante proporciona un análisis de regresión y un análisis de varianza para una variable dependiente mediante uno o más factores o variables. Las variables de factor dividen la población en grupos. El procedimiento MLG univariante permite contrastar hipótesis nulas sobre los efectos de otras variables en las medias de varias agrupaciones de una única variable dependiente. Además, se incluyen los efectos de las covariables y las interacciones de covariables con los factores. Para el análisis de regresión, las variables independientes se especifican como covariables.

Se dispone de muestras de k subpoblaciones y sobre cada individuo de cada muestra se mide una variable Y , tal que su distribución en cada subpoblación es normal de media cero y varianza σ^2_α :

$$\alpha_j \approx N(0, \sigma^2_\alpha)$$

En consecuencia, para comprobar que el comportamiento de la variable X es independiente del grupo, la hipótesis nula que se contrasta es:

$$H_0: \sigma^2_\alpha = 0$$

El estadístico de contraste es F . Si el p -valor asociado a F es menor que α , se rechazará la hipótesis nula al nivel de significación α . Entonces, existirán diferencias entre todos los posibles niveles del factor Y , de los que los k examinados son una muestra.

En nuestro caso se utilizó la longitud total (LT) del animal como covariable y como efectos las poblaciones, cuencas y vertientes.

2.3.2.7 Análisis de Componentes Principales

Los datos se han analizado con los paquetes estadísticos STATISTICA 5.0, 1995 y el S.P.A.D.N. 5.5, 2002.

El análisis de componentes principales constituye un procedimiento exploratorio de las relaciones multivariantes de un conjunto de variables. Se consideran todas las variables y se obtienen unas nuevas variables que llamaremos ejes o variables factoriales (componentes o factores principales) obtenidas de tal forma que, un número reducido de ellas sintetizan de manera óptima la información proporcionada por las variables originales. Esta reducción de dimensionalidad permite obtener una representación aproximada en un plano de las distancias o correlaciones.

Al trabajar con las variables factoriales, a un grupo de variables con alta correlación entre ellas le corresponde una única coordenada, que representa un factor clasificatorio. La importancia de este factor quedará determinada por la variabilidad que presente en los datos, es decir, por su poder discriminatorio.

El análisis de componentes principales se ha realizado, por un lado, con todos los individuos en su conjunto (considerando a los 435 individuos de las once poblaciones españolas, de ambos sexos) y por otro, con machos (248 individuos) y hembras (187 individuos) de forma separada.

Para la obtención de clases hemos utilizado una estrategia de clasificación que se ha dividido en las siguientes fases:

- *Partición preliminar para obtener clases estables*

El propósito es obtener grupos con la garantía de ser muy homogéneos. Una *clase estable* estará formada por individuos que siempre se clasificaron juntos en cada una de las particiones generadas. El número de clases estables será

muy inferior al de elementos iniciales sin agrupar y superior al que se seleccionará como definitivo posteriormente.

- *Agregación jerárquica de grupos estables*

La agregación jerárquica reconstituye grupos que fueron fragmentados y agrega elementos aparentemente dispersos con los grupos más próximos.

- *Partición final*

El número de clases de la tipología final queda definido al cortar el árbol jerárquico que muestra el proceso de agregación. El corte o los cortes de interés se deducen observando el histograma de los índices de agregación.

- *Descripción de las clases*

Una vez determinadas las clases definitivas se procede a su descripción en función de las variables del estudio. La descripción consiste en caracterizar cada clase por las variables que presentan en ella medias superiores (o inferiores) a los valores medios en el conjunto total. Se calculan estadísticos que miden esta diferencia y se transforman en *valores test*, comparables con los valores de una distribución $N(0,1)$. De esta manera se obtiene para cada clase una ordenación de las variables estadísticamente significativas en la clase.

Una variable (variables continuas en nuestro caso) es "*característica*" de una clase si la media calculada para los casos de la clase (media clase) es diferente de la media calculada con el conjunto total de casos (media general).

Resultados

3 RESULTADOS

3.1 ESTRUCTURA GENÉTICO-POBLACIONAL DE LA ESPECIE

Austropotamobius pallipes

Todos los apartados referentes a los resultados sobre la estructura genético-poblacional de la especie *A. pallipes* seguirán el siguiente orden. En primer lugar presentaremos los resultados correspondientes a las once poblaciones españolas analizadas con diez cebadores. Y, al final de cada apartado, se presentarán los resultados referidos a la muestra italiana analizada con tres de los diez cebadores anteriores en relación a las poblaciones españolas, siempre respecto a estos tres cebadores. La inclusión de la muestra de Italia, aún cuando de tamaño muestral bajo, puede ser útil como referente.

3.1.1 Frecuencias

La utilización de 10 cebadores ha permitido la obtención de 133 productos de amplificación, todos ellos reproducibles, en 275 individuos pertenecientes a 11 poblaciones de la especie *Austropotamobius pallipes*. Además, con los cebadores OPA01, OPA06 y OPA12 se analizó también una población italiana en la que se observaron 5 bandas más, ausentes en las poblaciones españolas.

En las Figuras 10 a 19 se muestran perfiles típicos de RAPD para cada uno de los cebadores utilizados, en diversas muestras de las poblaciones del estudio.

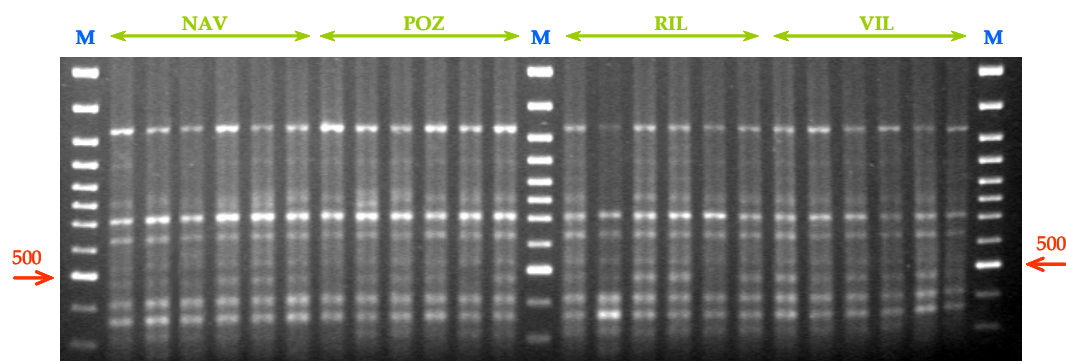


Figura 10. Perfiles de RAPD obtenidos utilizando el cebador OPA01 en la especie *Austropotamobius pallipes* de diferentes poblaciones.

En las columnas 2-7, población de NAV; en las columnas 8-13, POZ; en las columnas 15-20, RIL; en las columnas 21-26, VIL. En las columnas 1, 14 y 27 el marcador escalera de peso molecular de 100 pb (M); señalada la banda del marcador de 500 pb.

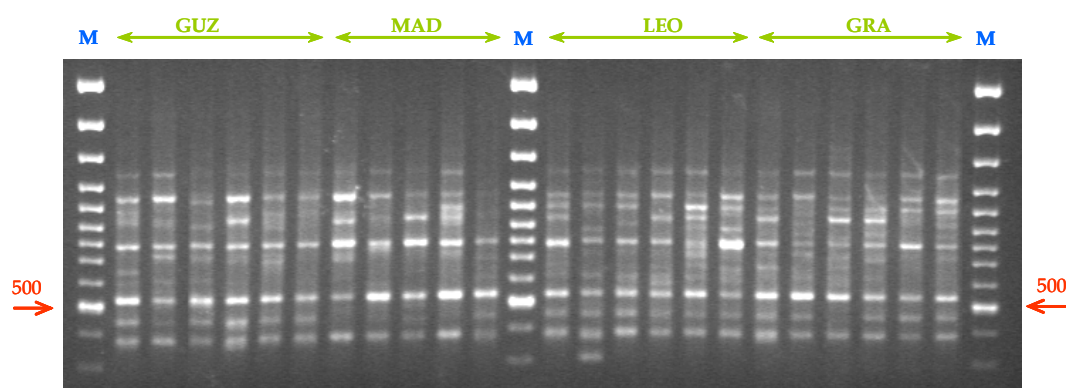


Figura 11. Perfiles de RAPD obtenidos utilizando el cebador OPA06 en la especie *Austropotamobius pallipes* de diferentes poblaciones.

En las columnas 2-7, población de GUZ; en las columnas 8-12, MAD; en las columnas 14-19, LEO; en las columnas 20-25, GRA. En las columnas 1, 13 y 26 el marcador escalera de peso molecular de 100 pb (M); señalada la banda del marcador de 500 pb.

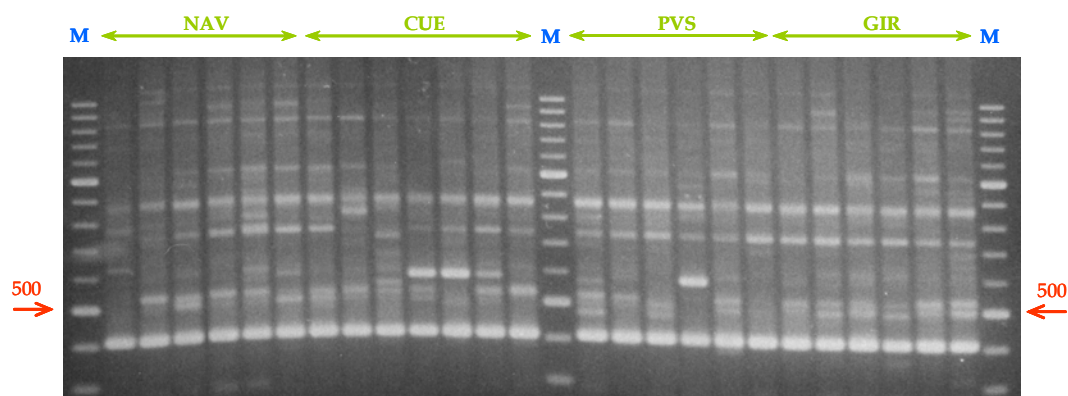


Figura 12. Perfiles de RAPD obtenidos utilizando el cebador OPA11 en la especie *Austropotamobius pallipes* de diferentes poblaciones.

En las columnas 2-7, población de NAV; en las columnas 8-14, CUE; en las columnas 16-21, PVS; en las columnas 22-27, GIR. En las columnas 1,15 y 28 el marcador escalera de peso molecular de 100 pb (M); señalada la banda del marcador de 500 pb.

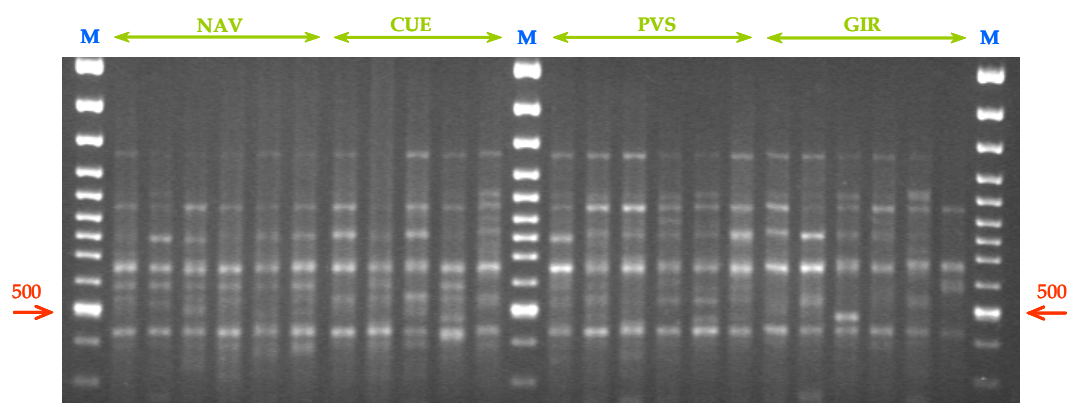


Figura 13. Perfiles de RAPD obtenidos utilizando el cebador OPA12 en la especie *Austropotamobius pallipes* de diferentes poblaciones.

En las columnas 2-7, población de NAV; en las columnas 8-12, CUE; en las columnas 14-19, PVS; en las columnas 20-25, GIR. En las columnas 1, 13 y 26 el marcador escalera de peso molecular de 100 pb (M); señalada la banda del marcador de 500 pb.

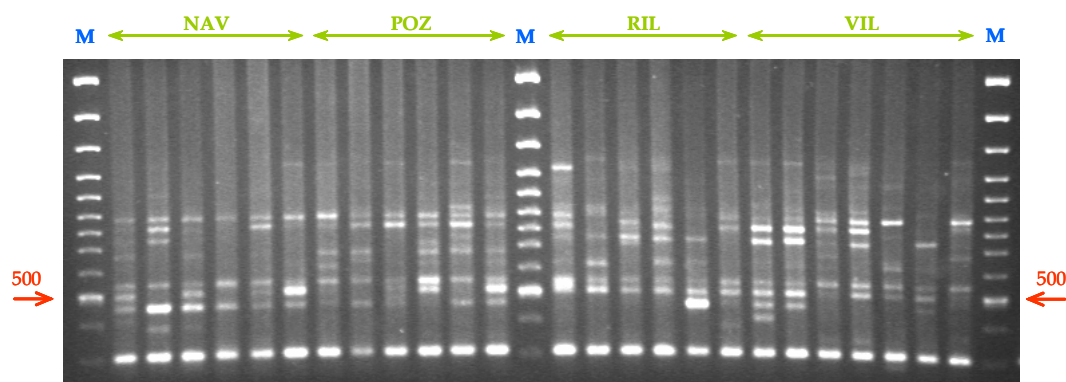


Figura 14. Perfiles de RAPD obtenidos utilizando el cebador OPC04 en la especie *Austropotamobius pallipes* de diferentes poblaciones.

En las columnas 2-7, la población de NAV; en las columnas 8-13, POZ; en las columnas 15-20, RIL; en las columnas 21-27, VIL. En las columnas 1, 14 y 28 el marcador escalera de peso molecular de 100 pb (M); señalada la banda del marcador de 500 pb.

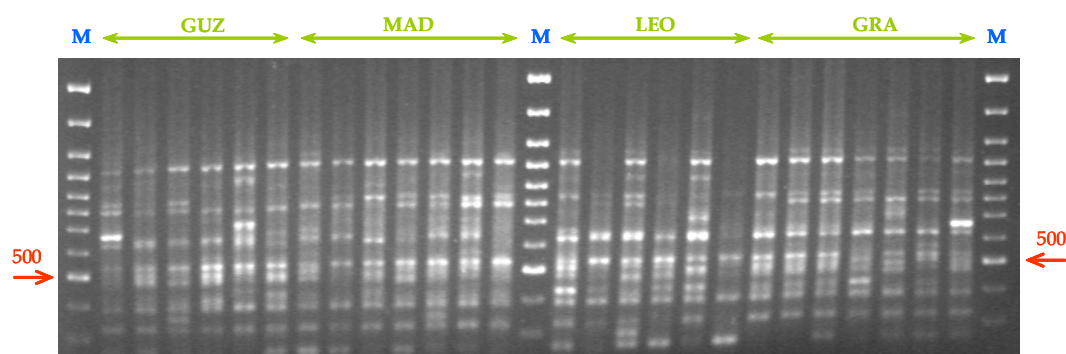


Figura 15. Perfiles de RAPD obtenidos utilizando el cebador OPC06 en la especie *Austropotamobius pallipes* de diferentes poblaciones.

En las columnas 2-7, la población de GUZ; en las columnas 8-14, MAD; en las columnas 16-21, LEO; en las columnas 22-28, GRA. En las columnas 1, 15 y 29 el marcador escalera de peso molecular de 100 pb (M); señalada la banda del marcador de 500 pb.

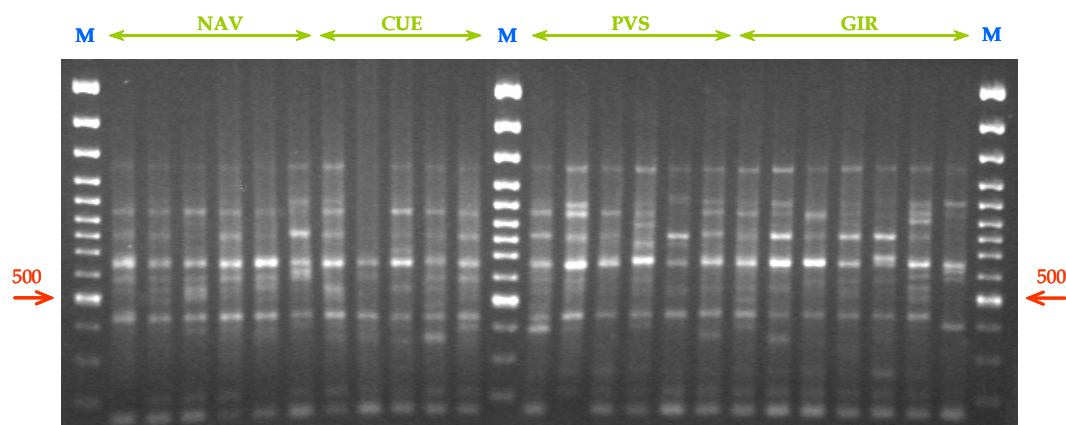


Figura 16. Perfiles de RAPD obtenidos utilizando el cebador OPC07 en la especie *Austropotamobius pallipes* de diferentes poblaciones.

En las columnas 2-7, la población de NAV; en las columnas 8-12, CUE; en las columnas 14-19, PVS; en las columnas 20-26, GIR. En las columnas 1, 13 y 27 el marcador escalera de peso molecular de 100 pb (M); señalada la banda del marcador de 500 pb.

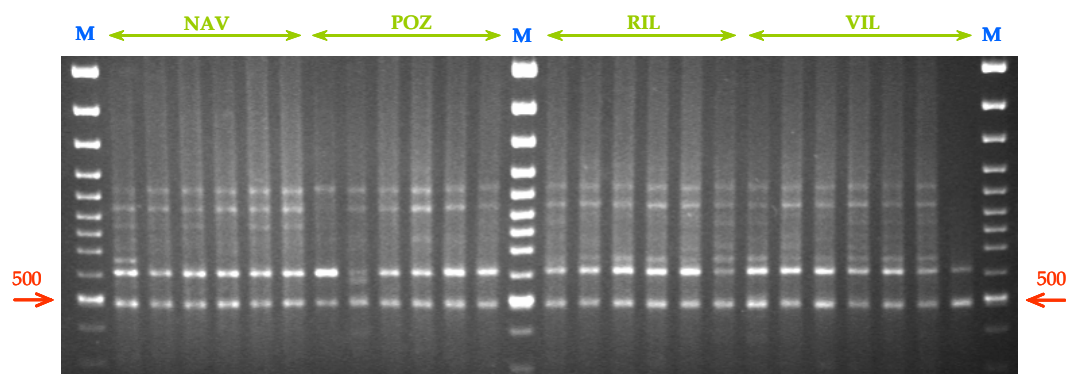


Figura 17. Perfiles de RAPD obtenidos utilizando el cebador OPC14 en la especie *Austropotamobius pallipes* de diferentes poblaciones.

En las columnas 2-7, la población de NAV; en las columnas 8-13, POZ; en las columnas 15-20, RIL; en las columnas 21-27, VIL. En las columnas 1, 14 y 28 el marcador escalera de peso molecular de 100 pb (M); señalada la banda del marcador de 500 pb.

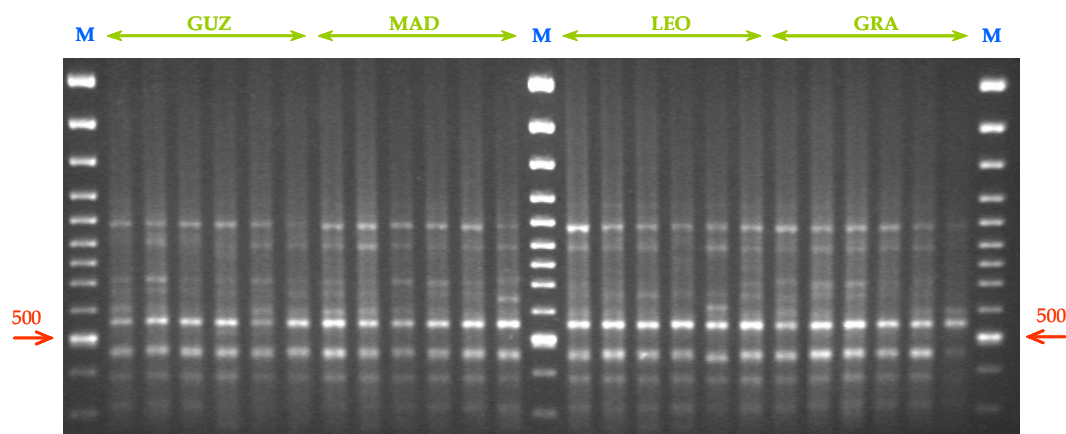


Figura 18. Perfiles de RAPD obtenidos utilizando el cebador OPC15 en la especie *Austropotamobius pallipes* de diferentes poblaciones.

En las columnas 2-7, la población de GUZ; en las columnas 8-13, MAD; en las columnas 15-20, LEO; en las columnas 21-26, GRA. En las columnas 1, 14 y 27 el marcador escalera de peso molecular de 100 pb (M); señalada la banda del marcador de 500 pb.

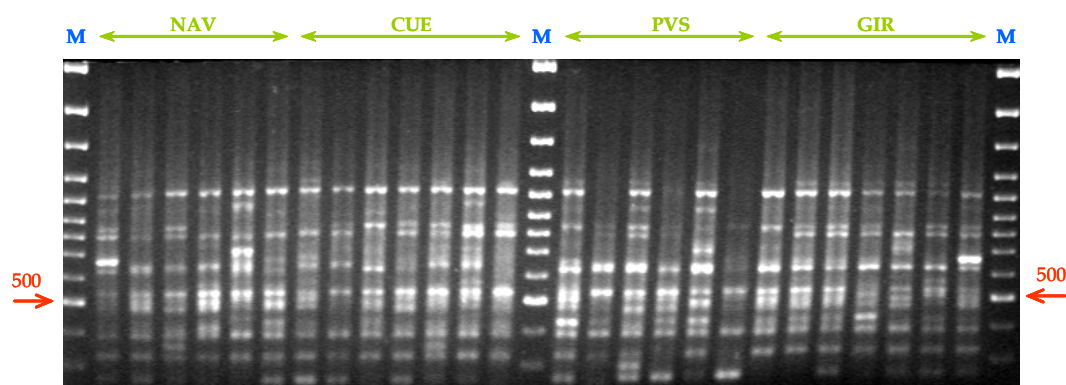


Figura 19. Perfiles de RAPD obtenidos utilizando el cebador OPC16 en la especie *Austropotamobius pallipes* de diferentes poblaciones.

En las columnas 2-7, la población de NAV; en las columnas 8-14, CUE; en las columnas 16-21, PVS; en las columnas 22-28, GIR. En las columnas 1, 15 y 29 el marcador escalera de peso molecular de 100 pb (M); señalada la banda del marcador de 500 pb.

A partir de la lectura de los perfiles de RAPD se construyeron las correspondientes matrices de presencia-ausencia, sobre las que se calcularon las frecuencias de cada una de las bandas amplificadas. En las Tablas 9 a 18 se presentan estas frecuencias, que oscilan entre 0,04 y 1, cuando la banda está presente en todos los individuos analizados de la población. Las Tablas 9, 10 y 12 incluyen también la muestra italiana (COS). Además, en estas tablas también aparece el tamaño de las bandas, que oscila entre 300 y 1380 pares de bases, si bien la mayoría están incluidas dentro del rango 400-1000 pares de bases.

		POBLACIONES											
		COS	CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	NAV	POZ	PVS	RIL	VIL
BANDAS	1 (1200)	-	1	1	-	-	-	-	0,44	-	1	-	-
	2 (1059)	-	1	1	1	1	0,52	1	0,48	0,68	1	1	1
	3 (978)	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4 (922)	-	0,24	0,52	0,32	1	0,40	0,40	0,68	0,56	1	1	1
	5 (860)	0,30	-	0,20	0,40	-	0,12	0,32	0,44	0,36	-	-	-
	6 (800)	-	1	1	1	0,20	0,48	0,32	0,32	1	1	0,56	1
	7 (740)	0,70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8 (720)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	9 (666)	-	-	1	1	-	1	0,28	0,36	0,48	1	0,52	-
	10 (650)	0,10	-	0,32	-	-	-	-	-	-	-	0,28	-
	11 (600)	0,20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	12 (557)	0,50	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	1
	13 (528)	1	-	-	-	1	-	1	1	0,36	-	-	1
	14 (488)	-	1	1	1	-	1	0,28	0,48	0,40	1	0,40	0,20
	15 (466)	-	1	-	-	-	0,16	-	0,32	0,24	1	-	-
	16 (422)	-	-	-	-	0,40	0,32	1	0,24	0,36	-	0,36	1
	17 (400)	0,70	1	1	-	0,32	1	-	-	-	1	1	1

Tabla 9. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPA01 en las poblaciones de *A. pallipes* estudiadas.

En la primera columna las cifras entre paréntesis se refieren al peso molecular de la banda correspondiente. (-): ausencia de banda.

		POBLACIONES											
		COS	CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	NAV	POZ	PVS	RIL	VIL
BANDAS	1 (1350)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
	2 (1200)	-	1	1	-	0,08	0,28	-	0,64	1	1	1	1
	3 (1059)	0,30	-	-	-	-	-	-	0,32	-	-	-	-
	4 (1031)	-	-	0,36	-	-	0,12	-	-	-	-	0,28	1
	5 (978)	0,50	1	0,36	1	0,12	0,32	-	0,32	0,20	0,40	0,12	-
	6 (926)	-	0,44	0,16	-	-	-	0,48	1	1	1	1	1
	7 (870)	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8 (840)	-	0,20	0,28	0,28	0,32	0,20	0,08	0,40	0,20	0,16	-	0,28
	9 (800)	0,40	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	10 (775)	-	-	-	-	-	-	0,16	-	-	-	-	-
	11 (750)	0,30	-	0,08	0,60	-	0,20	1	-	-	-	-	0,12
	12 (700)	-	0,32	1	0,12	1	0,28	-	0,24	0,20	1	0,72	-
	13 (665)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,24	1	-
	14 (633)	1	0,24	0,20	-	0,16	-	-	0,36	0,20	0,20	1	0,44
	15 (600)	-	0,60	1	-	1	0,48	1	0,20	0,16	0,08	0,24	-
	16 (550)	0,30	-	-	-	0,08	-	-	-	-	-	-	-
	17 (516)	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	18 (487)	1	-	1	-	0,28	0,24	0,40	0,08	-	-	-	-
	19 (437)	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	20 (375)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 10. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPA06 en las poblaciones de *A. pallipes* estudiadas.

En la primera columna las cifras entre paréntesis se refieren al peso molecular de la banda correspondiente. (-): ausencia de banda.

		POBLACIONES											
		CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	NAV	POZ	PVS	RIL	VIL	
BANDAS	1 (1009)	-	-	-	-	-	-	0,08	-	-	-	-	
	2 (922)	-	0,64	-	1	0,68	-	0,20	-	0,60	-	-	
	3 (875)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	4 (850)	0,24	0,60	1	-	1	0,32	0,16	-	0,24	0,52	0,24	
	5 (780)	-	0,12	-	-	-	-	0,24	-	-	0,12	-	
	6 (740)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	7 (616)	0,16	0,24	0,20	1	0,24	0,20	0,28	0,20	0,32	0,28	-	
	8 (600)	0,44	0,24	1	0,28	0,40	0,32	1	0,28	0,44	0,32	1	
	9 (562)	1	0,32	0,64	0,44	1	1	0,24	0,40	-	0,32	0,40	
	10 (525)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,48	
	11 (500)	0,52	0,44	1	0,32	0,44	0,24	0,56	0,32	0,28	0,28	0,60	
	12 (448)	-	0,20	-	0,24	0,48	0,32	0,28	-	0,24	0,24	0,36	
	13 (400)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

Tabla 11. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPA11 en las poblaciones de *A. pallipes* estudiadas.

En la primera columna las cifras entre paréntesis se refieren al peso molecular de la banda correspondiente. (-): ausencia de banda.

		POBLACIONES											
		COS	CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	NAV	POZ	PVS	RIL	VIL
BANDAS	1 (940)	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2 (800)	-	-	-	-	-	-	-	0,16	-	-	-	-
	3 (780)	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	4 (700)	0,30	-	0,32	0,32	0,24	-	-	1	-	-	-	-
	5 (633)	1	-	1	1	1	0,52	1	1	0,60	1	-	0,36
	6 (600)	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7 (575)	-	-	-	-	1	-	0,64	-	-	-	-	-
	8 (550)	0,60	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	9 (500)	-	-	0,48	-	-	-	-	0,24	-	-	-	-
	10 (462)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	11 (437)	0,60	1	0,20	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	12 (400)	0,30	-	0,08	-	0,20	1	-	0,08	-	0,52	-	-
	13 (350)	0,40	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 12. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPA12 en las poblaciones de *A. pallipes* estudiadas.

En la primera columna las cifras entre paréntesis se refieren al peso molecular de la banda correspondiente. (-): ausencia de banda.

		POBLACIONES										
		CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	NAV	POZ	PVS	RIL	VIL
BANDAS	1 (1275)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2 (926)	-	-	-	-	0,08	-	-	-	-	-	-
	3 (860)	-	-	-	-	0,04	-	-	-	-	-	-
	4 (800)	-	-	1	-	0,16	0,12	-	-	-	-	-
	5 (760)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	6 (720)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	7 (684)	-	-	-	0,20	-	-	-	-	-	-	-
	8 (633)	1	1	1	0,52	0,28	0,48	-	1	-	-	0,52
	9 (600)	0,28	-	0,44	1	0,36	1	0,60	0,16	1	-	0,40
	10 (557)	-	1	1	1	1	1	1	0,20	-	-	1
	11 (514)	-	-	-	-	0,16	-	-	-	-	-	-
	12 (500)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	13 (488)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	14 (445)	-	-	-	0,04	-	-	-	-	-	-	-
	15 (400)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	16 (377)	-	-	0,08	0,12	0,20	0,12	-	-	-	1	-

Tabla 13. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPC04 en las poblaciones de *A. pallipes* estudiadas.

En la primera columna las cifras entre paréntesis se refieren al peso molecular de la banda correspondiente. (-): ausencia de banda.

		POBLACIONES										
		CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	NAV	POZ	PVS	RIL	VIL
BANDAS	1 (1166)	-	1	1	-	0,28	-	-	1	0,32	1	-
	2 (1069)	1	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	3 (978)	-	-	-	1	1	1	0,28	-	1	1	1
	4 (860)	-	-	-	0,24	0,24	1	-	-	0,08	-	0,16
	5 (800)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	6 (760)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	7 (740)	0,16	0,64	-	-	-	-	-	0,24	1	0,36	-
	8 (684)	-	0,32	0,16	0,12	0,16	0,12	0,32	0,16	-	0,40	0,32
	9 (653)	-	1	1	0,16	0,52	0,08	0,32	-	0,72	1	1
	10 (600)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	11 (556)	-	0,12	-	-	-	-	-	1	-	0,16	-
	12 (528)	-	1	-	-	-	-	0,12	-	-	1	1
	13 (487)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	14 (462)	1	-	-	1	1	1	1	-	-	1	1
	15 (412)	1	1	-	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 14. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPC06 en las poblaciones de *A. pallipes* estudiadas.

En la primera columna las cifras entre paréntesis se refieren al peso molecular de la banda correspondiente. (-): ausencia de banda.

		POBLACIONES										
		CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	NAV	POZ	PVS	RIL	VIL
BANDAS	1 (1380)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2 (1031)	1	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	3 (944)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	4 (857)	-	-	-	-	-	-	0,16	-	-	-	-
	5 (800)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	6 (740)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
	7 (700)	-	-	-	0,28	0,16	-	0,20	-	0,16	0,16	-
	8 (671)	-	-	-	-	-	-	0,28	-	-	-	-
	9 (642)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	10 (587)	-	-	0,44	-	0,52	-	-	-	-	-	-
	11 (575)	-	-	-	-	-	-	0,40	0,48	-	0,36	0,24
	12 (537)	1	1	-	1	-	1	0,12	-	1	-	0,12
	13 (512)	-	1	-	1	-	1	0,56	0,52	1	-	-
	14 (475)	1	-	0,52	-	0,36	-	-	-	1	1	0,44
	15 (412)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 15. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPC07 en las poblaciones de *A. pallipes* estudiadas.

En la primera columna las cifras entre paréntesis se refieren al peso molecular de la banda correspondiente. (-): ausencia de banda.

		POBLACIONES										
		CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	NAV	POZ	PVS	RIL	VIL
BANDAS	1 (1059)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2 (944)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	3 (840)	-	-	-	0,12	-	-	-	-	-	-	-
	4 (700)	1	-	1	1	1	1	-	-	1	-	-
	5 (650)	1	1	1	1	1	1	-	-	1	-	-
	6 (643)	1	-	-	-	-	0,20	-	-	0,12	-	-
	7 (600)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	8 (487)	-	1	-	0,08	0,08	-	-	-	-	-	-
	9 (438)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 16. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPC14 en las poblaciones de *A. pallipes* estudiadas.

En la primera columna las cifras entre paréntesis se refieren al peso molecular de la banda correspondiente. (-): ausencia de banda.

		POBLACIONES										
		CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	NAV	POZ	PVS	RIL	VIL
BANDAS	1 (1031)	1	1	-	0,52	0,12	0,28	0,56	0,40	1	0,60	0,16
	2 (700)	-	1	-	-	-	-	-	-	0,20	-	-
	3 (650)	-	1	-	-	-	-	-	-	-	0,08	-
	4 (600)	0,20	-	-	0,24	-	0,16	-	-	0,32	0,20	-
	5 (557)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	6 (528)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	7 (457)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	8 (370)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	9 (300)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 17. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPC15 en las poblaciones de *A. pallipes* estudiadas.

En la primera columna las cifras entre paréntesis se refieren al peso molecular de la banda correspondiente. (-): ausencia de banda.

		POBLACIONES										
		CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	NAV	POZ	PVS	RIL	VIL
BANDAS	1 (1171)	-	-	-	1	-	1	1	1	1	1	1
	2 (1031)	-	-	1	-	1	1	1	1	1	1	1
	3 (940)	-	-	-	1	-	1	1	1	-	1	1
	4 (880)	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
	5 (800)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	6 (720)	-	-	-	-	0,12	-	1	-	-	0,16	-
	7 (666)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	8 (585)	-	0,28	-	0,08	0,28	-	0,12	0,40	0,08	0,16	0,28
	9 (514)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	10 (462)	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-
	11 (425)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1
	12 (400)	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13 (380)	-	-	0,24	-	-	-	-	-	-	-	-
	14 (350)	1	1	1	-	1	-	-	-	1	-	-

Tabla 18. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPC16 en las poblaciones de *A. pallipes* estudiadas.

En la primera columna las cifras entre paréntesis se refieren al peso molecular de la banda correspondiente. (-): ausencia de banda.

El número de fragmentos amplificados varía dependiendo del cebador utilizado (Tabla 19), desde 9 con los cebadores OPC14 y OPC15 hasta 19 con el OPA06, siendo el promedio por cebador de 13,6. Con respecto a las poblaciones, el número medio de bandas oscila entre 7,5 (CUE) y 9,7 (LEO), y el número total entre 75 (CUE) y 97 (LEO). Por supuesto, el total para la muestra italiana, analizada con sólo 3 cebadores, fue más bajo, 27 fragmentos (Tabla 19).

	OPA-01	OPA-06	OPA-11	OPA-12	OPC-04	OPC-06	OPC-07	OPC-14	OPC-15	OPC-16	\bar{X}	TOTAL
COS	9	9	-	9	-	-	-	-	-	-	9	27
CUE	10	11	8	5	8	7	7	7	7	5	7,5	75
GIR	12	14	11	9	8	10	6	6	8	7	9,1	91
GRA	9	8	8	7	11	7	7	6	5	8	7,6	76
GUZ	8	12	9	9	12	10	8	8	7	7	9,0	90
LEO	12	12	10	7	14	11	8	7	6	10	9,7	97
MAD	11	10	9	7	11	10	7	7	7	7	8,6	86
NAV	13	12	12	10	8	10	11	4	6	9	9,5	95
POZ	12	11	7	6	9	9	7	4	6	8	7,9	79
PVS	11	13	9	7	7	10	9	7	8	8	8,9	89
RIL	11	12	10	5	7	13	9	4	8	9	8,8	88
VIL	10	10	8	6	9	11	9	4	6	8	8,1	81
\bar{X}	10,8	11,3	9,1	7	9,4	10,8	9	5,8	6,1	7,8	13,6	
TOTAL	15	19	13	11	16	15	15	9	9	14		

Tabla 19. Número de bandas diferentes amplificadas por cebador en cada población.

Número medio y total de bandas por población (dos últimas columnas) y número medio y total de bandas por cebador (dos últimas filas).

De los productos amplificados en las once poblaciones españolas, del total de 133 bandas, se encontró que 40 eran comunes en todos los individuos analizados (2 bandas con el cebador OPA01, 4 con el OPA06, 3 con el OPA11, 4 con el OPA12, 6 con el OPC04, 4 con el OPC06, 5 con el OPC07, 4 con el OPC14, 5 con el OPC15 y 3 con el OPC16). En la Tabla 20 se muestran las bandas monomórficas en todas las poblaciones, el cebador con el que se obtuvieron y su peso molecular.

Cuando nos fijamos en las doce poblaciones (incluida la muestra italiana) y para sólo 3 cebadores, del total de 50 bandas, se encontró que 3 eran comunes a todos los individuos analizados, una con cada uno de los 3 cebadores OPA01, OPA06 y OPA12 (Tabla 21).

Hay que mencionar la existencia de 7 bandas comunes a todos los individuos analizados de las once poblaciones españolas (OPA01-11, OPA06-

09, OPA06-17, OPA06-19, OPA12-03, OPA12-08, OPA12-13) y que están ausentes en la muestra italiana (Tablas 20 y 21).

CEBADOR	BANDA (pb)	CEBADOR	BANDA (pb)
OPA01	8 (720)	OPC06	6 (760)
OPA01	11 (600)	OPC06	10 (600)
OPA06	9(800)	OPC06	13 (487)
OPA06	17 (516)	OPC07	1 (1380)
OPA06	19 (437)	OPC07	3 (944)
OPA06	20 (375)	OPC07	5 (800)
OPA11	3 (875)	OPC07	9 (642)
OPA11	6 (740)	OPC07	15 (412)
OPA11	13 (400)	OPC14	1 (1059)
OPA12	3 (780)	OPC14	2 (944)
OPA12	8 (550)	OPC14	7 (600)
OPA12	10 (462)	OPC14	9 (438)
OPA12	13 (350)	OPC15	5 (557)
OPC04	1 (1275)	OPC15	6 (528)
OPC04	5 (760)	OPC15	7 (457)
OPC04	6 (720)	OPC15	8 (370)
OPC04	12 (500)	OPC15	9 (300)
OPC04	13 (488)	OPC16	5 (800)
OPC04	15 (400)	OPC16	7 (666)
OPC06	5 (800)	OPC16	9 (514)

Tabla 20. Bandas monomórficas encontradas, con 10 cebadores, en los 275 individuos analizados de las once poblaciones españolas de *A. pallipes*.

CEBADOR	BANDA (pb)
OPA01	8 (720)
OPA06	20 (375)
OPA12	10 (462)

Tabla 21. Bandas monomórficas encontradas para los cebadores OPA01, OPA06 y OPA12, en los 285 individuos analizados de las doce poblaciones de *A. pallipes* estudiadas.

En la Tabla 22 aparecen las bandas exclusivas de población, que son bandas que únicamente se encuentran en una determinada población aunque no necesariamente en el 100% de sus individuos. En esta Tabla se indica cada banda con su peso molecular, el cebador con el que se ha obtenido, la población a la que pertenece y su frecuencia. No se ha observado, en el presente trabajo, ninguna banda presente en el 100% de los individuos de una población.

Las bandas exclusivas de población encontradas en este estudio representan el 11,76% del total de bandas detectadas. Se encuentran en las poblaciones del Río Ega (NAV) y A. Guztar (GUZ), con 5 y 4 bandas exclusivas respectivamente; 3 bandas exclusivas presenta la población de la L. Valsemana (LEO) y 2 la del R. Nervión (PVS); por último, las poblaciones del M. Madalena (MAD) y A. Ermitas (GRA) presentan 1 banda exclusiva cada una. La frecuencia máxima de las bandas exclusivas, dentro de las poblaciones españolas, corresponde a la banda OPA06-03, presente en un 32% de los individuos de la población del R. Ega (NAV). El resto de las bandas exclusivas se encuentran presentes en menos de un 30% de los individuos analizados.

Se observa que la población de Coscile (COS) presenta 5 bandas exclusivas. La frecuencia máxima, al tener en cuenta a las doce poblaciones, corresponde a la banda OPA01-07 presente en un 70% de los individuos de la muestra italiana.

CEBADOR	BANDA (pb)	POBLACIÓN	FRECUENCIA
OPA01	3 (978)	COS	0,30
OPA01	7 (740)	COS	0,70
OPA06	7 (870)	COS	0,30
OPA06	3 (1059)	NAV	0,32
OPA06	9 (775)	MAD	0,16
OPA06	12 (665)	PVS	0,24
OPA06	15 (550)	GUZ	0,08
OPA11	1 (1009)	NAV	0,08
OPA12	1 (800)	NAV	0,16
OPC04	2 (926)	LEO	0,08
OPC04	3 (860)	LEO	0,04
OPC04	7 (684)	GUZ	0,20
OPC04	11 (514)	LEO	0,16
OPC04	14 (445)	GUZ	0,04
OPC07	4 (857)	NAV	0,16
OPC07	8 (671)	NAV	0,28
OPA12	1 (940)	COS	0,30
OPA12	6 (600)	COS	0,30
OPC14	3 (840)	GUZ	0,12
OPC15	2 (700)	PVS	0,20
OPC16	13 (380)	GRA	0,24

Tabla 22. Bandas exclusivas encontradas en las poblaciones de *A. pallipes* analizadas.

3.1.2 Polimorfismo

Basándonos en la frecuencia de cada una de las bandas se calculó el polimorfismo en las once poblaciones españolas de *A. pallipes* y el polimorfismo total (Tabla 23). La proporción media de loci polimórficos (P) en este caso es de 0,15. Las poblaciones que presentan mayor polimorfismo son las del Río Ega (NAV) y Laguna Valsemana (LEO), con un 24 y un 22%, respectivamente. Las poblaciones con menor polimorfismo observado son las de Arroyo Cuende (CUE) y Arroyo Ermitas (GRA), con 7 y un 8%, respectivamente. Mientras, el polimorfismo de la Astacifactoría de Rillo (RIL) es algo superior (17%) al valor medio observado para la especie en las poblaciones españolas. El cebador que detecta mayor polimorfismo es el

OPA11 (37%) y los que muestran el menor son el OPC14 y OPC16 (5 y 7%, respectivamente).

Al analizar junto a las poblaciones españolas de *A. pallipes* la población de la Región de Calabria (COS) (Tabla 23) y considerando los datos de los tres cebadores (OPA01, OPA06, OPA12), la proporción media de loci polimórficos (P) aumenta, en este caso, hasta 22%. Las poblaciones que presentan mayor polimorfismo son las de Coscile (COS) y Río Ega (NAV), con un porcentaje del 41% y 38%, respectivamente, y la que menor la del Río Guadazaón (VIL) con un valor del 9%. En esta misma tabla se muestran las bandas polimórficas para cada cebador y población.

		POBLACIONES														11 poblaciones		12 poblaciones												
		COS		CUE		GIR		GRA		GUZ		LEO		MAD		NAV		POZ		PVS		RIL		VIL		\bar{X}	Total	\bar{X}	Total	
CEBADORES	OPA-01	0,41	7	0,06	1	0,20	3	0,14	2	0,20	3	0,40	6	0,34	5	0,60	9	0,54	8	-	-	0,34	5	0,07	1	0,26	43	0,26	50	
	OPA-06	0,30	6	0,26	5	0,31	6	0,15	3	0,31	6	0,42	8	0,21	4	0,42	8	0,26	5	0,26	5	0,21	4	0,15	3	0,27	57	0,26	63	
	OPA-11	-	-	0,28	4	0,57	8	0,14	2	0,28	4	0,35	5	0,35	5	0,57	8	0,28	4	0,42	6	0,50	7	0,35	5	0,37	58	-	-	
	OPA-12	0,53	7	-	-	0,36	4	0,09	1	0,18	2	0,09	1	0,09	1	0,27	3	0,09	1	0,09	1	-	-	0,09	1	0,12	15	0,16	22	
	OPC-04	-	-	0,06	1	-	-	0,12	2	0,25	4	0,43	7	0,18	3	0,06	1	0,12	2	-	-	-	-	0,12	2	0,12	22	-	-	
	OPC-06	-	-	0,06	1	0,20	3	0,06	1	0,20	3	0,26	4	0,14	2	0,26	4	0,14	2	0,20	3	0,20	3	0,14	2	0,16	28	-	-	
	OPC-07	-	-	-	-	-	-	0,14	2	0,06	1	0,20	3	-	-	0,40	6	0,14	2	0,06	1	0,14	2	0,20	3	0,16	20	-	-	
	OPC-14	-	-	-	-	-	-	-	-	0,22	2	0,11	1	0,11	1	-	-	-	-	0,11	1	-	-	-	-	0,05	5	-	-	
	OPC-15	-	-	0,11	1	-	-	-	-	0,23	2	0,11	1	0,22	2	0,11	1	0,11	1	0,23	2	0,34	3	0,11	1	0,14	14	-	-	
	OPC-16	-	-	-	-	0,07	1	0,07	1	0,07	1	0,14	2	-	-	0,07	1	0,07	1	0,07	1	0,14	2	0,07	1	0,07	11	-	-	
\bar{X} / Total (11 poblaciones)		-	-	0,07	13	0,15	25	0,08	14	0,18	28	0,22	38	0,15	23	0,24	41	0,15	26	0,13	20	0,17	26	0,11	19	0,15				
\bar{X} / Total (12 poblaciones)		0,41	20	0,15	6	0,25	13	0,11	6	0,20	11	0,27	15	0,18	10	0,38	20	0,26	14	0,16	6	0,24	9	0,09	5	0,22				

Tabla 23. Polimorfismo estimado, con el criterio del 95%, con cada uno de los cebadores empleados y para el conjunto de cebadores, en cada una de las poblaciones analizadas y en el conjunto de poblaciones.

Las dos últimas filas y columnas corresponden a las once poblaciones españolas con los diez cebadores y a las doce poblaciones con los tres cebadores, respectivamente.

En verde se muestra el número de bandas polimórficas en cada caso (por poblaciones y cebadores).

3.1.3 Análisis de Ji-cuadrado

Para cada una de las 96 bandas variables observadas en las poblaciones españolas se ha realizado una prueba Ji-Cuadrado (χ^2) con el fin de comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas respecto a su frecuencia entre las poblaciones. También se ha realizado un test de diferencias estandarizadas (observadas-esperadas) en la frecuencia de las bandas en cada una de las poblaciones para así comprobar si la frecuencia de cada banda en una población determinada, era mayor (valor mayor de 3) o menor (valor menor de -3) que su frecuencia en el conjunto de poblaciones. En las Tablas 24 a 33 se muestran los resultados de la prueba χ^2 y del test de diferencias estandarizadas con cada uno de los cebadores utilizados.

pb	Frec. global	χ^2	POBLACIONES										
			CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	POZ	NAV	PVS	RIL	VIL
1 (1200)	31,3	246,3*	7,8	7,8	-3,5	-3,5	-3,5	-3,5	-3,5	-	7,8	-3,5	-3,5
2 (1055)	88,0	105,3*	-	-	-	-	-5,8	-	-3,2	-6,5	-	-	-
3 (922)	64,7	100,5*	-4,5	-	-3,6	3,9	-	-	-	-	3,9	3,9	3,9
4 (860)	16,7	59,6*	-	-	3,3	-	-	-	-	3,8	-	-	-
5 (800)	71,6	140,7*	3,3	3,3	3,3	-6,0	-	-4,6	3,3	-4,6	3,3	-	3,3
7 (666)	51,3	181,8*	-5,4	5,1	5,1	-5,4	5,1	-	-	-	5,1	-	-5,4
8 (650)	5,5	71,8*	-	6,1	-	-	-	-	-	-	-	5,2	-
10 (557)	90,9	275,0*	-	-	-	-16,6	-	-	-	-	-	-	-
11 (528)	39,6	250,9*	-4,2	-4,2	-4,2	6,5	-4,2	6,5	-	6,5	-4,2	-4,2	6,5
12 (488)	61,5	159,8*	4,2	4,2	4,2	-6,6	4,2	-3,6	-	-	4,2	-	-4,5
13 (466)	24,7	203,2*	9,1	-3,0	-3,0	-3,0	-	-3,0	-	-	9,1	-3,0	-3,0
14 (422)	33,5	151,4*	-3,7	-3,7	-3,7	-	-	7,4	-	-	-3,7	-	7,4
15 (400)	57,5	252,7*	4,5	4,5	-6,1	-	4,5	-6,1	-6,1	-6,1	4,5	4,5	4,5

Tabla 24. Frecuencia global y valor de χ^2 , para las distintas bandas, con el cebador OPA01.

En la primera columna las cifras entre paréntesis se refieren al peso molecular de la banda correspondiente.

*: valores significativos de χ^2 para un nivel de significación de 0,01.

pb	Frec. global	χ^2	POBLACIONES										
			CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	POZ	NAV	PVS	RIL	VIL
1 (1350)	9,1	275,0*	-	-	-	-	-	-	-	-	16,6	-	-
2 (1200)	63,6	220,4*	4,0	4,0	-6,9	-6,1	-3,9	-6,9	4,0	-	4,0	4,0	4,0
3 (1059)	2,9	82,4*	-	-	-	-	-	-	-	9,1	-	-	-
4 (1031)	16,0	175,0*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,0
5 (978)	34,9	134,5*	7,2	-	7,2	-	-	-3,8	-	-	-	-	-3,8
6 (926)	55,3	211,3*	-	-4,1	-5,8	-5,8	-5,8	-	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7
7 (840)	21,8	18,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9 (775)	1,5	40,6*	-	-	-	-	-	6,4	-	-	-	-	-
10 (750)	18,2	177,7*	-	-	5,7	-	-	11,1	-	-	-	-	-
11 (705)	44,4	166,7*	-	5,9	-3,4	5,9	-	-4,7	-	-	5,9	-	-4,7
12 (665)	11,3	229,4*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,7	-
13 (633)	25,5	107,2*	-	-	-3,1	-	-3,1	-3,1	-	-	-	9,0	-
14 (600)	43,3	169,1*	-	6,0	-4,6	6,0	-	6,0	-	-	-3,7	-	-4,6
15 (550)	0,7	20,1	-	-	-	4,5	-	-	-	-	-	-	-
17 (487)	18,2	157,8*	-	11,1	-	-	-	3,0	-	-	-	-	-

Tabla 25. Frecuencia global y valor de χ^2 , para las distintas bandas, con el cebador OPA06.

En la primera columna las cifras entre paréntesis se refieren al peso molecular de la banda correspondiente.

*: valores significativos de χ^2 para un nivel de significación de 0,01

pb	Frec. global	χ^2	POBLACIONES										
			CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	POZ	NAV	PVS	RIL	VIL
1 (1009)	0,7	20,1	-	-	-	-	-	-	-	4,5	-	-	-
2 (920)	28,4	170,7*	-	4,1	-3,3	8,3	4,6	-	-3,3	-	3,7	-3,3	-3,3
4 (850)	39,3	129,4*	-	-	6,5	-4,2	6,5	-	-4,2	-	-	-	-
5 (780)	4,4	39,2*	-	-	-	-	-	-	-	5,0	-	-	-
7 (618)	28,4	78,1*	-	-	-	8,3	-	-	-	-	-	-	-3,3
8 (600)	52,0	99,4*	-	-	5,0	-	-	-	-	-5,0	-	-	5,0
9 (562)	52,4	117,2*	5,0	-	-	-	5,0	5,0	-	-3,0	-5,5	-	-
10 (525)	95,3	136,5*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,7
11 (500)	45,5	48,2*	-	-	-5,7	-	-	-	-	-	-	-	-
12 (448)	21,5	36,7*	-	-	-	-	3,4	-	-	-	-	-	-

Tabla 26. Frecuencia global y valor de χ^2 , para las distintas bandas, con el cebador OPA11.

En la primera columna las cifras entre paréntesis se refieren al peso molecular de la banda correspondiente.

*: valores significativos de χ^2 para un nivel de significación de 0,01

pb	Frec. global	χ^2	POBLACIONES										
			CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	POZ	NAV	PVS	RIL	VIL
1 (802)	1,5	40,6*	-	-	-	-	-	-	-	6,4	-	-	-
3 (700)	17,1	166,0*	-	-	-	-	-	-	-	11,6	-	-	-
4 (633)	68,0	192,3*	-7,6	3,6	3,6	3,6	-	3,6	-	3,6	3,6	-7,6	-3,6
5 (575)	14,9	229,6*	-	-	-	12,5	-	7,2	-	-	-	-	-
7 (505)	6,5	98,4*	-	8,8	-	-	-	-	-	3,7	-	-	-
9 (437)	92,7	215,7*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-14,7
10 (400)	17,1	176,8*	-	-	-	-	11,6	-	-	-	4,9	-	-

Tabla 27. Frecuencia global y valor de χ^2 , para las distintas bandas, con el cebador OPA12.

En la primera columna las cifras entre paréntesis se refieren al peso molecular de la banda correspondiente.

*: valores significativos de χ^2 para un nivel de significación de 0,01

pb	Frec. global	χ^2	POBLACIONES										
			CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	POZ	NAV	PVS	RIL	VIL
2 (928)	0,7	20,1	-	-	-	-	4,5	-	-	-	-	-	-
3 (862)	0,4	10,0	-	-	-	-	3,2	-	-	-	-	-	-
4 (806)	11,6	216,6*	-	-	14,5	-	-	-	-	-	-	-	-
7 (684)	1,8	50,9*	-	-	-	7,1	-	-	-	-	-	-	-
8 (635)	52,7	179,7*	-	5,0	5,0	-	-	-	5,0	-5,5	-5,5	-5,5	-
9 (605)	47,6	145,4*	-	-5,0	-	5,5	-	5,5	-3,3	-	5,5	-5,0	-
10 (560)	65,5	257,3*	-7,2	3,8	3,8	3,8	-3,8	3,8	-5,0	3,8	-7,2	-7,2	3,8
11 (515)	1,5	40,6*	-	-	-	-	6,4	-	-	-	-	-	-
14 (445)	0,4	10,0	-	-	-	3,2	-	-	-	-	-	-	-
16 (377)	13,8	181,6*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13,1	-

Tabla 28. Frecuencia global y valor de χ^2 , para las distintas bandas, con el cebador OPC04.

En la primera columna las cifras entre paréntesis se refieren al peso molecular de la banda correspondiente.

*: valores significativos de χ^2 para un nivel de significación de 0,01.

pb	Frec. global	χ^2	POBLACIONES										
			CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	POZ	NAV	PVS	RIL	VIL
1 (1166)	41,8	231,9*	-4,4	6,2	6,2	-4,4	-	-4,4	6,2	-4,4	-	6,2	-4,4
2 (1069)	90,9	275,0*	-	-16,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 (978)	57,1	254,4*	-6,0	-6,0	-6,0	4,5	4,5	4,5	-6,0	3,1	4,5	4,5	4,5
4 (865)	15,6	166,4*	-	-	-	-	-	12,2	-	-	-	-	-
7 (745)	21,8	161,0*	-	5,54	-	-	-	-	-	-	9,9	-	-
8 (685)	18,9	29,3*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9 (653)	52,7	187,1*	-5,5	5,0	5,0	-3,9	-	-4,7	-5,5	-	-	5,0	5,0
9 (556)	11,6	216,6*	-	-	-	-	-	-	14,5	-	-	-	-
12 (528)	28,4	262,0*	-3,3	8,3	-3,3	-3,3	-3,3	-3,3	-3,3	-	-3,3	8,3	8,3
14 (465)	63,6	275,0*	4,0	-6,9	-6,9	4,0	4,0	4,0	-6,9	4,0	-6,9	4,0	4,0
15 (412)	90,9	275,0*	-	-	-16,6	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 29. Frecuencia global y valor de χ^2 , para las distintas bandas, con el cebador OPC06.

En la primera columna las cifras entre paréntesis se refieren al peso molecular de la banda correspondiente.

*: valores significativos de χ^2 para un nivel de significación de 0,01.

pb	Frec. global	χ^2	POBLACIONES										
			CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	POZ	NAV	PVS	RIL	VIL
2 (1031)	90,9	275,0*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-16,6
4 (857)	1,5	40,6*	-	-	-	-	-	-	-	6,4	-	-	-
6 (740)	18,2	275,0*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,1	11,1
7 (700)	8,7	35,0*	-	-	-	3,6	-	-	-	-	-	-	-
8 (671)	2,5	71,8*	-	-	-	-	-	-	-	8,5	-	-	-
10 (587)	8,7	119,3*	-	-	6,6	-	8,0	-	-	-	-	-	-
11 (575)	13,5	81,3*	-	-	-	-	-	-	5,3	4,1	-	3,5	-
12 (537)	47,6	253,8*	5,5	5,5	-5,0	5,5	-5,0	5,5	-5,0	-3,7	5,5	-5,0	-3,7
13 (512)	16,2	225,1*	-	5,7	-4,9	5,7	-4,9	5,7	-	-	5,7	-4,9	-4,9
14 (475)	39,3	198,9*	6,5	-4,2	-	-4,2	-	-4,2	-4,2	-4,2	6,5	6,5	-

Tabla 30. Frecuencia global y valor de χ^2 , para las distintas bandas, con el cebador OPC07.

En la primera columna las cifras entre paréntesis se refieren al peso molecular de la banda correspondiente.

*: valores significativos de χ^2 para un nivel de significación de 0,01

pb	Frec. global	χ^2	POBLACIONES										
			CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	POZ	NAV	PVS	RIL	VIL
3 (845)	1,1	30,3*	-	-	-	5,5	-	-	-	-	-	-	-
4 (705)	54,5	275,0*	4,8	-5,7	4,8	4,8	4,8	4,8	-5,7	-5,7	4,8	-5,7	-5,7
5 (650)	63,6	275,0*	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	-6,9	-6,9	4,0	-6,9	-6,9
7 (600)	12,0	212,1*	14,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8 (488)	10,5	236,0*	-	15,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 31. Frecuencia global y valor de χ^2 , para las distintas bandas, con el cebador OPC14.

En la primera columna las cifras entre paréntesis se refieren al peso molecular de la banda correspondiente.

*: valores significativos de χ^2 para un nivel de significación de 0,01.

pb	Frec. global	χ^2	POBLACIONES										
			CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	POZ	NAV	PVS	RIL	VIL
1 (1031)	51,3	133,1*	5,1	5,1	-5,4	-	-4,1	-	-	-	5,1	-	-3,7
2 (700)	10,9	233,8*	-	15,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 (655)	9,8	254,2*	-	15,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 (605)	10,2	41,4*	-	-	-	-	-	-	-	-	3,8	-	-

Tabla 32. Frecuencia global y valor de χ^2 , para las distintas bandas, con el cebador OPC15.

En la primera columna las cifras entre paréntesis se refieren al peso molecular de la banda correspondiente.

*: valores significativos de χ^2 para un nivel de significación de 0,01.

pb	Frec. global	χ^2	POBLACIONES										
			CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	POZ	NAV	PVS	RIL	VIL
1 (1171)	63,6	275,0*	-6,9	-6,9	-6,9	4,0	-6,9	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
2 (1030)	7207	275,0*	-8,6	-8,6	3,2	-	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2
3 (940)	54,5	275,0*	-5,7	-5,7	-5,7	4,8	-5,7	4,8	4,8	4,8	-5,7	4,8	4,8
4 (880)	9,1	275,0*	-	-	-	-	16,6	-	-	-	-	-	-
6 (720)	11,6	216,6*	-	-	-	-	-	-	-	14,5	-	-	-
8 (585)	15,3	37,0*	-	-	-	-	-	-	3,6	-	-	-	-
10 (462)	18,2	275,0*	-	-	11,1	-	11,1	-	-	-	-	-	-
12 (400)	9,1	275,0*	-	16,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13 (380)	2,2	61,3*	-	-	7,8	-	-	-	-	-	-	-	-
14 (350)	45,5	275,0*	5,7	5,7	5,7	-4,8	5,7	-4,8	-4,8	-4,8	5,7	-4,8	-4,8

Tabla 33. Frecuencia global y valor de χ^2 , para las distintas bandas, con el cebador OPC16.

En la primera columna las cifras entre paréntesis se refieren al peso molecular de la banda correspondiente.

*: valores significativos de χ^2 para un nivel de significación de 0,01.

En la Tabla 34 se resumen los resultados de las pruebas de χ^2 y de los tests de diferencias estandarizadas. Vemos que el mayor número de bandas con frecuencia significativamente diferente de la frecuencia media aparecen en las poblaciones del A. Santa Margarida (GIR) y A. Ermitas (GRA), con un total de 43 bandas con diferente frecuencia. Por otro lado, las poblaciones de la Astacifactoría de Rillo (RIL) y R. Ega (NAV) son las que presentan menor número de bandas con frecuencia significativamente distinta de la frecuencia media, siendo, aún así, en 32 de las 96 bandas. Y por último, el promedio es de 35 bandas en cada población que se apartan de la frecuencia media.

			POBLACIONES											
			CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	NAV	POZ	PVS	RIL	VIL	
CEBADORES	OPA01	(15)												
	+		5	6	4	2	3	2	2	1	7	3	5	
	-		4	3	6	6	3	5	3	3	2	3	4	
	Total		9	9	10	8	6	7	5	4	9	6	9	13
	OPA06	(19)												
	+		2	4	2	3	0	4	2	2	4	4	3	
	-		0	1	5	2	3	4	0	0	1	0	3	
	Total		2	5	7	5	3	8	2	2	5	4	6	15
	OPA11	(13)												
	+		1	1	2	2	4	1	2	0	1	0	2	
	-		0	0	2	1	0	0	2	2	1	1	2	
	Total		1	1	4	3	4	1	4	2	2	1	4	10
	OPA12	(11)												
	+		0	2	1	2	1	2	4	0	2	0	0	
	-		1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
	Total		1	3	1	2	1	2	4	0	2	1	1	7
	OPC04	(16)												
	+		0	2	3	4	3	2	1	1	1	1	1	
	-		1	1	0	0	1	0	1	2	2	3	0	
	Total		1	3	3	4	4	2	2	3	3	4	1	10
	OPC06	(16)												
	+		1	4	2	2	2	3	1	2	2	5	4	
	-		4	3	4	3	1	3	2	4	2	0	1	
	Total		5	7	6	5	3	6	3	6	4	5	5	11
	OPC07	(16)												
	+		2	3	1	3	1	2	3	1	3	3	1	
	-		0	1	2	1	2	1	2	2	0	2	2	
	Total		2	4	3	4	3	3	5	3	3	5	3	10
	OPC14	(9)												
	+		3	2	2	3	2	2	0	0	2	0	0	
	-		0	1	0	0	0	0	2	2	0	2	2	
	Total		3	3	2	3	2	2	2	2	2	2	2	5
	OPC15	(9)												
	+		1	3	0	0	0	0	0	0	2	0	0	
	-		0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	
	Total		1	3	1	0	1	0	0	0	2	0	1	4
	OPC16	(12)												
	+		1	2	4	2	4	3	4	4	3	3	3	
	-		3	3	2	1	2	1	1	1	1	1	1	
	Total		4	5	6	3	6	4	5	5	4	4	4	10
Total			29	43	43	37	33	35	32	27	36	32	36	

Tabla 34. Número total de bandas por población y por cebador cuya frecuencia es significativamente menor (-) o mayor (+) que la frecuencia media de la banda en el conjunto de las once poblaciones españolas.

En la última fila se muestra la suma de las bandas para cada población considerando el total de cebadores. La última columna señala el número de bandas cuya frecuencia presenta diferencias significativas entre diferentes poblaciones en el caso del cebador correspondiente. A la derecha de cada cebador se indica, entre paréntesis, el número total de bandas amplificadas por el mismo.

Por otra parte, según el análisis de χ^2 , las frecuencias son significativamente diferentes entre poblaciones en 94 de las 96 bandas observadas (97,91%). De las bandas cuyas frecuencias varían significativamente entre poblaciones, la mayoría (40) se apartan de la media en una sola población, 12 en dos poblaciones, 3 en tres y cuatro poblaciones respectivamente, 1 en cinco y siete poblaciones respectivamente, 7 en seis poblaciones, 5 en ocho poblaciones, 6 en nueve y diez poblaciones respectivamente, y 8 en todas las poblaciones.

En las Tablas 35 a 37 se muestran los resultados de la prueba χ^2 y del test de diferencias estandarizadas con cada uno de los cebadores utilizados en las doce poblaciones analizadas de *A. pallipes*.

pb	Frec. global	χ^2	POBLACIONES											
			COS	CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	POZ	NAV	PVS	RIL	VIL
1 (1200)	30,2	255,8*	-	8,0	8,0	-3,4	-3,4	-3,4	-3,4	-3,4	-	8,0	-3,4	-3,4
2 (1059)	84,9	145,1*	-7,6	-	-	-	-	-4,8	-	-	-5,4	-	-	-
3 (978)	1,1	83,4*	9,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 (922)	62,5	115,1*	-4,2	-4,2	-	-	4,1	-	-	-	-	4,1	4,1	4,1
5 (860)	16,1	63,4*	-	-	-	3,4	-	-	-	-	4,0	-	-	-
6 (800)	69,1	157,2*	-4,8	3,5	3,5	3,5	-5,6	-	-4,2	3,5	-4,2	3,5	-	3,5
7 (740)	2,5	197,3*	14,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8 (720)	96,5	285,0*	-19,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9 (666)	49,5	191,9*	-3,2	-5,2	5,3	5,3	-5,2	5,3	-	-	-	5,3	-	-5,2
10 (650)	5,3	74,8*	-	-	6,3	-	-	-	-	-	-	-	5,3	-
11 (600)	96,5	285,0*	-16,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12 (557)	87,7	285,0*	-8,6	-	-	-	-14,0	-	-	-	-	-	-	-
13 (528)	38,2	260,6*	-	-4,1	-4,1	-	6,7	-4,1	6,7	-	6,7	-4,1	-4,1	6,7
14 (488)	59,3	172,0*	-3,9	4,3	4,3	4,3	-6,3	4,3	-3,3	-	-	4,3	-	-4,2
15 (466)	23,9	211,5*	-	9,4	-	-	-	-	-	-	-	9,4	-	-
16 (422)	32,3	159,1*	-	-3,6	-3,6	-3,6	-	-	7,6	-	-	-3,6	-	7,6
17 (400)	55,4	263,0*	-3,6	4,7	4,7	-5,8	-	4,7	-5,8	-5,8	-5,8	4,7	4,7	4,7

Tabla 35. Frecuencia global y valor de χ^2 , para las distintas bandas, con el cebador OPA01.

En la primera columna las cifras entre paréntesis se refieren al peso molecular de la banda correspondiente.

*: valores significativos de χ^2 para un nivel de significación de 0,01.

pb	Frec. global	χ^2	POBLACIONES											
			COS	CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	POZ	NAV	PVS	RIL	VIL
1 (1350)	8,8	285,0*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,9	-	-
2 (1200)	61,4	231,7*	-4,1	4,2	4,2	-6,6	-5,7	-3,6	-6,6	4,2	-	4,2	4,2	4,2
3 (1059)	2,8	85,6*	-	-	-	-	-	-	-	-	9,3	-	-	-
4 (1031)	15,4	182,1*	-	-	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	12,3
5 (978)	33,7	142,1*	-	7,3	-	7,3	-	-	-3,7	-	-	-	-	-3,7
6 (926)	53,3	221,7*	-3,4	-	-3,9	-5,6	-5,6	-5,6	-	4,9	4,9	-4,9	4,9	4,9
7 (870)	1,1	83,4*	9,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8 (840)	21,1	21,7*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9 (800)	96,5	285,0*	-16,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 (775)	1,4	42,2*	-	-	-	-	-	-	6,5	-	-	-	-	-
11 (750)	17,5	184,9*	-	-	-	5,8	-	--	11,3	-	-	-	-	-
12 (700)	42,8	175,9*	-	-	6,1	-3,3	6,1	-	-4,5	-	-	6,1	3,1	-4,5
13 (665)	10,9	238,0*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15,0	-
14 (633)	24,6	113,2*	-	-	-	-3,0	-	-3,0	-3,0	-	-	-	9,2	-
15 (600)	41,8	178,1*	-	-	6,2	-4,4	6,2	-	6,2	-	-	-3,6	-	-4,4
16 (550)	0,7	20,9*	-	-	-	-	4,6	-	-	-	-	-	-	-
17 (516)	96,5	285,0*	-16,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18 (487)	17,5	164,4*	-	-	11,3	-	-	-	-3,1	-	-	-	-	-
19 (437)	96,5	285,0*	-16,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20 (375)	96,5	285,0*	-16,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 36. Frecuencia global y valor de χ^2 , para las distintas bandas, con el cebador OPA06.

En la primera columna las cifras entre paréntesis se refieren al peso molecular de la banda correspondiente.

*: valores significativos de χ^2 para un nivel de significación de 0,01.

pb	Frec. global	χ^2	POBLACIONES											
			COS	CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	POZ	NAV	PVS	RIL	VIL
1 (940)	1,1	83,4*	9,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 (800)	1,4	42,2*	-	-	-	-	-	-	-	-	6,5	-	-	-
3 (780)	96,5	285,0*	-16,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 (700)	16,5	172,9*	-	-	-	-	-	-	-	-	11,8	-	-	-
5 (633)	65,6	205,2*	-4,4	-7,2	3,8	3,8	3,8	-	3,8	-	3,8	3,8	-7,2	-3,3
6 (600)	14,4	238,2*	-	-	-	-	12,8	-	7,4	-	-	-	-	-
7 (575)	1,1	83,4*	9,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8 (550)	96,5	285,0*	-16,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9 (500)	6,3	102,5*	-	-	9,0	-	-	-	-	-	-3,8	-	-	-
10 (462)	96,5	285,0*	-16,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11 (437)	89,5	242,5*	-9,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12 (400)	16,5	183,9*	-	-	-	-	-	11,8	-	-	-	5,0	-	-
13 (350)	96,5	285,0*	-16,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 37. Frecuencia global y valor de χ^2 , para las distintas bandas, con el cebador OPA12.

En la primera columna las cifras entre paréntesis se refieren al peso molecular de la banda correspondiente.

*: valores significativos de χ^2 para un nivel de significación de 0,01.

Al considerar la muestra de Coscile (COS) y las poblaciones españolas analizadas únicamente con los 3 cebadores (OPA01, OPA06 y OPA12), según el análisis de χ^2 , las frecuencias son significativamente diferentes entre poblaciones en el 100% de las 50 bandas observadas. En la prueba de χ^2 y del test de diferencias estandarizadas (Tabla 38), el promedio es de 14 bandas que se apartan de la frecuencia media. El mayor número de bandas con frecuencia significativamente diferente de la frecuencia media aparece en la población del Río Guadazón (VIL), con un total de 26 bandas de diferente frecuencia (52%) y el menor corresponde a la población del A. Cuende (CUE) en la que 5 bandas presentan una frecuencia significativamente distinta de la media (10%). Según el análisis de χ^2 , las frecuencias son significativamente diferentes entre poblaciones en todas las bandas observadas (100%).

			POBLACIONES												
			COS	CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	NAV	POZ	PVS	RIL	VIL	
CEBADORES	OPA01	(17)													
	+		2	1	3	5	2	2	3	4	7	5	6	2	
	-		3	2	2	3	5	4	3	3	2	4	2	9	
	Total		5	3	5	8	7	6	6	7	9	9	8	11	
	OPA06	(20)													
	+		2	2	5	3	3	4	0	2	4	2	5	1	
	-		0	0	0	3	2	4	3	5	1	0	1	6	
	Total		2	2	5	6	5	8	3	7	5	2	6	7	
	OPA12	(13)													
	+		4	0	0	0	2	2	1	1	2	0	2	2	
	-		0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	6	
	Total		4	0	1	1	2	2	1	1	2	1	3	8	
Total			11	5	11	15	14	16	10	15	16	12	17	26	

Tabla 38. Número total de bandas por población y por cebador cuya frecuencia es significativamente menor (-) o mayor (+) que la frecuencia media de la banda en el conjunto de las doce poblaciones.

En la última fila se muestra la suma de las bandas para cada población considerando el total de cebadores. La última columna señala el número de bandas cuya frecuencia presenta diferencias significativas entre diferentes poblaciones en el caso del cebador correspondiente. A la derecha de cada cebador se indica, entre paréntesis, el número total de bandas amplificadas por el mismo.

3.1.4 Índice de diversidad

Los valores del índice de diversidad de Shannon (H_o) por cebador en cada una de las poblaciones estudiadas se encuentran en la Tabla 39. En ella se presentan los valores de diversidad encontrados para cada cebador por separado y el valor medio, con los diez cebadores utilizados en el caso de las poblaciones españolas, y con los 3 cebadores en el caso de la muestra italiana.

		POBLACIONES												11 pobla.	12 pobla.
		COS	CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	NAV	POZ	PVS	RIL	VIL	\bar{x}	\bar{x}
CEBADORES	OPA01	0,0207	0,0129	0,0225	0,0156	0,0294	0,0434	0,0485	0,0400	0,0302	0,0000	0,0205	0,0138	0,0251	0,0220
	OPA06	0,0406	0,0342	0,0593	0,0194	0,0612	0,0630	0,0331	0,0622	0,0554	0,0586	0,0150	0,0286	0,0445	0,0385
	OPA11	-	0,0314	0,0566	0,0063	0,0404	0,0250	0,0602	0,0913	0,0438	0,0480	0,0729	0,0235	0,0468	-
	OPA12	0,0550	0,0000	0,0502	0,0134	0,0363	0,0016	0,0107	0,0532	0,0078	0,0016	0,0000	0,0107	0,0185	0,0103
	OPC04	-	0,0157	0,0000	0,0212	0,0475	0,0645	0,0202	0,0078	0,0380	0,0000	0,0000	0,0062	0,0205	-
	OPC06	-	0,0192	0,0212	0,0192	0,0378	0,0176	0,0350	0,0454	0,0368	0,0157	0,0378	0,0134	0,0279	-
	OPC07	-	0,0000	0,0000	0,0031	0,0157	0,0284	0,0000	0,0562	0,0023	0,0192	0,0300	0,0409	0,0195	-
	OPC14	-	0,0000	0,0000	0,0000	0,0428	0,0200	0,0229	0,0000	0,0000	0,0227	0,0000	0,0000	0,0108	-
	OPC15	-	0,0229	0,0000	0,0000	0,0195	0,0227	0,0427	0,0058	0,0096	0,0393	0,0334	0,0235	0,0196	-
	OPC16	-	0,0000	0,0123	0,0138	0,0129	0,0269	0,0000	0,0146	0,0061	0,0129	0,0302	0,0123	0,0142	-
\bar{x} (11 poblaciones)		-	0,0235	0,0222	0,0112	0,0343	0,0313	0,0273	0,0376	0,0230	0,0218	0,0239	0,0172	0,0247	
\bar{x} (12 poblaciones)		0,0387	0,0123	0,0375	0,0131	0,0371	0,0352	0,0255	0,0428	0,0283	0,0150	0,0126	0,0142	0,0260	

Tabla 39. Valores del índice de diversidad de Shannon (H_o) en las poblaciones de *A. pallipes* analizadas para los diferentes cebadores utilizados.

Las dos últimas filas y columnas corresponden a las once poblaciones españolas con los diez cebadores y a las doce poblaciones, incluyendo la muestra italiana, con los tres cebadores, respectivamente.

Los índices de diversidad de las poblaciones oscilan entre 0,011 en la población del A. Ermitas (GRA) y 0,037 en la del R. Ega (NAV) (Tabla 39). En la Astacifactoría de Rillo (RIL) se observa un valor del índice de diversidad (0,0239) muy próximo al promedio para las poblaciones españolas de *A. pallipes*, 0,0247. Y atendiendo a los cebadores, el cebador OPA11 detecta el mayor índice de diversidad media (0,044), y con el cebador OPC14 se dan los valores más bajos de índices de diversidad en todas las poblaciones (\bar{X} = 0,010).

En la Tabla 40 aparecen los valores medios de diversidad dentro de poblaciones (Hpop), la diversidad total (Hsp), la proporción relativa de diversidad dentro de poblaciones (Hpop/Hsp) y entre poblaciones (Hsp-Hpop/Hsp) con cada uno de los 10 cebadores. En la última fila se muestran los valores medios. Se observa que los porcentajes de la diversidad total debidos a la diversidad intrapoblacional (Hpop/Hsp) e interpoblacional (Hsp-Hpop/Hsp), son muy similares, el 51% y el 49% respectivamente. Por otra parte cuando se incluye la muestra de Coscile (COS), y considerando los datos de los tres cebadores, los porcentajes observados de la diversidad total debidos a la diversidad intrapoblacional (Hpop/Hsp) e interpoblacional (Hsp-Hpop/Hsp), son del 44 y 55% (Tabla 41).

CEBADOR	Hpop	Hsp	Hpop/Hsp	(Hsp-Hpop/Hsp)
OPA01	0,0251	0,0530	0,4735	0,5264
OPA06	0,0445	0,0872	0,5103	0,4896
OPA11	0,0468	0,0481	0,9729	0,0270
OPA12	0,0185	0,0496	0,3729	0,6270
OPC04	0,0205	0,0344	0,5959	0,4040
OPC06	0,0279	0,0277	1,0072	0,0072
OPC07	0,0195	0,0611	0,3191	0,6808
OPC14	0,0108	0,0336	0,3214	0,6785
OPC15	0,0196	0,0644	0,3043	0,6956
OPC16	0,0142	0,0571	0,2486	0,7513
\bar{x}	0,0247±0,0120	0,0516±0,0175	0,5126±0,2731	0,4887±0,2702

Tabla 40. Estimaciones de la diversidad dentro de poblaciones (Hpop), diversidad total (Hsp) y proporción de diversidad dentro de poblaciones (Hpop/Hsp) y entre poblaciones (Hsp-Hpop/Hsp), para las once poblaciones españolas analizadas con 10 diez cebadores.

CEBADOR	Hpop	Hsp	Hpop/Hsp	(Hsp-Hpop/Hsp)
OPA01	0,0220	0,0035	0,3142	0,6857
OPA06	0,0385	0,0643	0,7236	0,2763
OPA12	0,0103	0,0176	0,2913	0,7087
\bar{x}	0,0260±0,0110	0,0235±0,0025	0,4430±0,2430	0,5569±0,2432

Tabla 41. Estimaciones de la diversidad dentro de poblaciones (Hpop), diversidad total (Hsp) y proporción de diversidad dentro de poblaciones (Hpop/Hsp) y entre poblaciones (Hsp-Hpop/Hsp), para las doce poblaciones analizadas con 3 cebadores.

3.1.5 Índice de similitud

A partir de los datos de presencia-ausencia de las bandas se han calculado los índices de similitud entre el total de 285 individuos analizados. Los valores de similitud interpoblacional e intrapoblacional se presentan en la Tabla 42. No se presentan los valores de similitud entre individuos puesto

que resultaría una tabla excesivamente grande y sus valores no son relevantes para la discusión de los resultados.

Los índices de similitud interpoblacionales considerando las once poblaciones españolas oscilan entre 0,70 al comparar las poblaciones de Río Ega (NAV) y Arroyo Santa Margarida (GIR) y 0,86 entre las poblaciones de la Astacifactoría Rillo (RIL) y Río Guadazaón (VIL), con un valor medio de 0,78.

Cuando se considera la muestra italiana se observan los valores de los índices de similitud interpoblacionales claramente menores, oscilando entre 0,44 y 0,57. El valor de similitud interpoblacional más bajo corresponde a la comparación entre la muestra italiana (COS) y la de Río Nervión (PVS).

Los valores de los índices de similitud intrapoblacionales son algo superiores y oscilan entre 0,78 en el caso de la Astacifactoría de Rillo (RIL) y 0,92 en la población de Arroyo Santa Margarida (GIR), con una media de 0,81.

CUE	0,8390											
GIR	0,7824	0,9181										
GRA	0,8127	0,7580	0,8089									
GUZ	0,7781	0,7268	0,7445	0,7900								
LEO	0,8036	0,7352	0,8391	0,7713	0,8020							
MAD	0,7865	0,7115	0,7837	0,8703	0,7942	0,7858						
NAV	0,7616	0,7020	0,7647	0,7980	0,7534	0,8118	0,7850					
POZ	0,8020	0,7453	0,8035	0,7846	0,7607	0,8116	0,8294	0,8019				
PVS	0,8409	0,7777	0,7831	0,7823	0,7859	0,7775	0,7676	0,7950	0,8348			
RIL	0,7790	0,7174	0,7458	0,7494	0,7596	0,7583	0,7845	0,8206	0,7908	0,7793		
VIL	0,7786	0,7134	0,7663	0,7871	0,7739	0,8167	0,8287	0,8344	0,7715	0,8625	0,7837	
COS	0,4917	0,4485	0,5790	0,5290	0,5392	0,5362	0,5236	0,5403	0,4482	0,4747	0,4832	0,7655
	CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	NAV	POZ	PVS	RIL	VIL	COS

Tabla 42. Índices de similitud.

Los índices interpoblacionales (en negro) e intrapoblacionales (en verde) han sido calculados a partir de los datos de presencia-ausencia de las bandas de RAPD en los individuos analizados en las doce poblaciones de *A. pallipes*.

3.1.6 Distancias genéticas

A partir de los datos de presencia–ausencia de bandas se determinaron los valores de distancia genética de Nei (1972) entre las 12 poblaciones analizadas. En la Tabla 43 se muestran estos valores junto con sus errores, valores que oscilan entre 0,07 y 0,27 en el caso de la comparación entre las poblaciones españolas y, entre 0,41 y 0,74 si incluimos la población italiana (COS).

El valor medio de la distancia genética entre las once poblaciones españolas es de 0,18. El valor más bajo de distancia se obtiene entre las poblaciones del A. Guztar (GUZ) y M. Madalena (MAD), con una distancia de 0,07. Mientras, el valor más elevado de distancia corresponde a la comparación entre la población del R. Guadazaón (VIL) y A. Santa Margarida (GIR), con una distancia de 0,27.

En términos generales, las mayores distancias genéticas son las que se observan entre la población de A. Santa Margarida (GIR) y el resto de poblaciones, con valores que oscilan entre 0,19 y 0,27 ($\bar{X}=0,24$), así como entre la población del A. Ermitas (GRA) con las demás poblaciones ($\bar{X}=0,19$). Por el contrario, las menores distancias genéticas se encuentran entre la población del A. Pozuelo (POZ) con el resto de poblaciones, con valores entre 0,08-0,22 ($\bar{X}=0,15$). En la Astacifactoría (RIL) se observan valores intermedios ($\bar{X}=0,21$), algo superiores al promedio de las poblaciones españolas de *A. pallipes*. En la Astacifactoría (RIL) se observan valores intermedios de distancias ($\bar{X}=0,21$), algo superiores al promedio de las poblaciones españolas de *A. pallipes*.

Considerando además a la muestra de Italia (COS) y los datos referidos a sólo tres cebadores, las mayores distancias genéticas son las que existen entre la población de COS y el resto de poblaciones, con valores que oscilan entre 0,41 y 0,74 ($\bar{X}=0,53$).

CUE	0,5537±0,1216											
GIR	0,6456±0,1346	0,1907±0,0360										
GRA	0,4843±0,1116	0,1645±0,0335	0,2107±0,0367									
GUZ	0,4808±0,1111	0,2048±0,0364	0,2497±0,0419	0,2383±0,0413								
LEO	0,4411±0,1053	0,1419±0,0327	0,2313±0,0411	0,1042±0,0266	0,1769±0,0370							
MAD	0,4824±0,1113	0,1906±0,0351	0,2723±0,0438	0,1955±0,0371	0,0715±0,0204	0,1425±0,0336						
NAV	0,4656±0,1089	0,1947±0,0406	0,2667±0,0467	0,1763±0,0371	0,1301±0,0345	0,1557±0,0335	0,1109±0,0333					
POZ	0,4158±0,1015	0,1561±0,0335	0,2202±0,0411	0,1535±0,0331	0,1763±0,0362	0,1691±0,0363	0,1470±0,0206	0,0828±0,0283				
PVS	0,7440±0,1486	0,1260±0,0294	0,1896±0,0339	0,1999±0,0367	0,1782±0,0355	0,1709±0,0355	0,1892±0,0365	0,1883±0,0399	0,1667±0,0361			
RIL	0,5375±0,1193	0,1980±0,0367	0,2651±0,0424	0,2334±0,0380	0,2089±0,0458	0,1856±0,0352	0,2018±0,0377	0,1387±0,0334	0,1108±0,0285	0,1740±0,0342		
VIL	0,5813±0,1255	0,2083±0,0368	0,2746±0,0423	0,2164±0,0373	0,1792±0,0347	0,1811±0,0356	0,1465±0,0315	0,0969±0,0299	0,1148±0,0299	0,2044±0,0362	0,0795±0,0226	
	COS	CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	NAV	POZ	PVS	RIL	

Tabla 43. Distancias genéticas de Nei entre las doce poblaciones de *A. pallipes* analizadas.

3.1.7 F_{ST} y Nm

Los valores del estadístico F_{ST} (índice de subdivisión de la población) y de la tasa efectiva de migración (Nm) en las poblaciones analizadas se muestran en la Tabla 44. Ambos valores se han calculado a través de tres métodos distintos (Wright, 1951; Weir y Cockerham, 1984 y Lynch y Milligan, 1994), para las once poblaciones españolas y la italiana.

Se observa que, en el conjunto de las doce poblaciones, los valores de F_{ST} oscilan entre 0,60 y 0,75, lo que significaría que entre el 60 y el 75% de la variabilidad genética de las poblaciones se debe a la diferenciación genética entre ellas. En todos los casos F_{ST} toma valores por encima de 0 ($F_{ST}>0$).

La tasa efectiva de migración (Nm) se calcula a partir de los valores de F_{ST} , como ya se indicó en el apartado de Material y Métodos, y hace referencia al número medio de emigrantes por generación entre una población y otra que podrían explicar la tasa de diferenciación entre ellas. Los valores observados de la tasa efectiva de migración (Nm) son, como puede observarse en la Tabla 44, menores que la unidad (0,1 y 0,2). La estima del estadístico Nm puede resultar útil por los movimientos de individuos a los que han estado sometidos las poblaciones de cangrejo de río (ver apartado de Material y Métodos).

	11 poblaciones		12 poblaciones	
	F_{ST}	Nm	F_{ST}	Nm
F_{ST} (Wright)	0,609±0,0301	0,2	0,644±0,0472	0,1
θ (Weir y Cockerham)	0,757±0,0306	0,1	0,749±0,0479	0,1
F_{ST} (Lynch y Milligan)	0,721±0,0310	0,1	0,741±0,0494	0,1

Tabla 44. Valores del estadístico F_{ST} y estimas de Nm en las doce poblaciones de *A. pallipes*.

3.1.8 Análisis de la varianza molecular (AMOVA)

En la Tabla 45 se muestran los resultados de los análisis de la varianza molecular, los tres primeros considerando únicamente las once poblaciones españolas y, el cuarto incluyendo la muestra de Italia.

El primer AMOVA se realizó para el conjunto de las once poblaciones españolas, calculándose la proporción de la variabilidad total atribuible a la variación entre poblaciones y a la variación entre los individuos pertenecientes a una misma población.

El siguiente AMOVA se llevó a cabo considerando las 11 poblaciones españolas estudiadas agrupadas en 8 cuencas hidrográficas (Tajo, Ebro, Duero, Júcar, Guadiana, Guadalquivir, cuenca del norte y Costero catalana) más la Astacifactoría de Rillo, calculándose la proporción de la variabilidad total atribuible a la variación entre cuencas y Astacifactoría de Rillo, entre poblaciones dentro de cuencas y dentro de poblaciones.

En el tercer AMOVA se consideraron las 11 poblaciones agrupadas en 2 vertientes (mediterránea, atlántica) y la Astacifactoría de Rillo. Se calculó el porcentaje de la variabilidad total atribuible a la variación entre vertientes y Astacifactoría de Rillo, entre poblaciones dentro de las vertientes y dentro de poblaciones.

Fuente de variación	Grados de libertad	SSD	Componente de la varianza	p	% de variación
Todas las poblaciones: 1 grupo					
Entre poblaciones	10	2561,26	10,05	< 0,001	67,55
Entre individuos de la misma población	264	1275,04	4,82	< 0,001	32,45
Todas las cuencas: 9 grupos					
Entre cuencas	8	2161,76	2,34	0,1070	15,74
Entre poblaciones dentro de cuencas	2	399,50	7,79	< 0,001	52,09
Dentro de poblaciones	264	1275,04	4,82	< 0,001	32,27
Todas las poblaciones: 3 vertientes					
Entre vertientes	2	540,23	0,22	0,3326	1,51
Entre poblaciones dentro de las vertientes	8	2021,03	9,91	< 0,001	66,22
Dentro de poblaciones	264	1275,04	4,82	< 0,001	32,27
Dos grupos: Población italiana/poblaciones españolas					
Entre grupos	1	169,39	6,68	0,0844	53,95
Entre poblaciones dentro de grupos	10	929,02	3,63	< 0,001	29,31
Dentro de poblaciones	273	566,60	2,07	< 0,001	16,74

Tabla 45. Resultados del análisis de la varianza molecular (AMOVA) con las poblaciones de *A. pallipes* analizadas.

En el primer análisis el porcentaje de la varianza total atribuible a la variación entre poblaciones es aproximadamente dos veces superior (67,55%) a la proporción de la variabilidad atribuible a diferencias entre individuos pertenecientes a la misma población, que es del 32,45% (los dos valores son estadísticamente significativos, $p < 0,001$).

En el AMOVA en el que se consideran 9 grupos correspondientes a las 8 cuencas hidrográficas y a la Astacifactoría de Rillo, el porcentaje de variación entre poblaciones dentro de cuencas es superior a la proporción de la variabilidad entre individuos de la misma población (52,09% y 32,27%, respectivamente). Ambos valores son significativos mientras que el porcentaje de variación entre cuencas hidrográficas, más Astacifactoría de Rillo, no es estadísticamente significativo ($p=0,1070$).

En el tercer AMOVA, en el que se han tenido en cuenta 3 grupos, correspondientes a las vertientes y la Astacifactoría de Rillo, el porcentaje de variación entre ellas no resulta estadísticamente significativo ($p=0,3326$). Por el contrario sí resulta estadísticamente significativo entre poblaciones dentro de las vertientes y entre individuos de la misma población. La proporción de variabilidad debida a poblaciones dentro de vertientes es superior (66,22%) a la variabilidad atribuible dentro de poblaciones (32,27%).

En la última parte de la Tabla 44 se muestran los resultados del análisis molecular de la varianza en el que se consideraron dos grupos, uno formado por todas las poblaciones españolas y el otro únicamente por la muestra de Italia. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. La proporción de variabilidad debida a poblaciones dentro de los grupos, es superior (29,31%) a la variabilidad atribuible dentro de poblaciones (16,74%).

3.1.9 Test de Mantel

El test de Mantel se realizó entre las matrices de distancias genéticas de Nei y de distancias geográficas entre las once poblaciones españolas analizadas. Tal y como se explicó en el apartado de Material y Métodos, si la matriz de distancias genéticas y la matriz de distancias geográficas muestran correlaciones similares, el estadístico Z debería ser mayor de lo que se espera por azar. El resultado obtenido se considera significativo si el valor del 95 por ciento o más de los estadísticos generados es mayor que el valor observado.

Nuestros resultados del test de Mantel indican que no existe correlación significativa entre las distancias geográficas y las distancias genéticas ($r=0,47$, $p[Z \text{ al azar} \leq Z \text{ observado}] = 0,01$).

3.1.10 Análisis de componentes principales

A partir de la matriz de presencia-ausencia de las bandas de RAPD se han realizado análisis de componentes principales con las once poblaciones españolas del estudio, y otros incluyendo la muestra italiana. A través del análisis factorial se pretende facilitar la interpretación de la información contenida en la matriz de correlaciones (Anexos 2 y 3).

Las proyecciones de las poblaciones sobre cada uno de los k primeros factores, denominados saturaciones, se disponen en una matriz de componentes para tratar de facilitar la interpretación de la solución obtenida. Dado que la suma de cuadrados de las saturaciones para cada población presenta valores muy bajos y alejados del 1, puede considerarse que las poblaciones no muestran correlación estadísticamente significativa, aún cuando pueden observarse algunas relaciones entre ellas. El valor más alejado del resto corresponde a la población de GIR (A. Santa Margarida) (0,0308), lo que significa que es la población menos correlacionada con el resto.

El primer análisis, de dos dimensiones, corresponde a las once poblaciones españolas. El primer eje absorbe un 40,12% de la varianza y el segundo el 21,09% (Figura 20). A pesar de que las poblaciones no muestran correlación significativa estadísticamente, la representación del análisis de componentes principales basado en los valores de las distancias de Nei nos permite extraer alguna información acerca de las relaciones entre las poblaciones. En la representación sobre los 2 ejes principales (Figura 20) observamos que el primer componente separa la población del noreste peninsular, GIR (A. Santa Margarida), del resto de poblaciones. Y el segundo componente separa a la población de la Astacifactoría, RIL. En el resto de las poblaciones las relaciones quedan menos claras, aún cuando se podrían apreciar ciertas aproximaciones entre poblaciones. Por un lado, las poblaciones de Arroyo Guztar (GUZ) y Manantial Madalena (MAD), ambas

poblaciones se encuentran localizadas en la región centro-norte de la península aunque pertenecen a cuencas hidrográficas diferentes, Ebro y Duero, respectivamente. Y por otro lado se observan el resto de poblaciones.

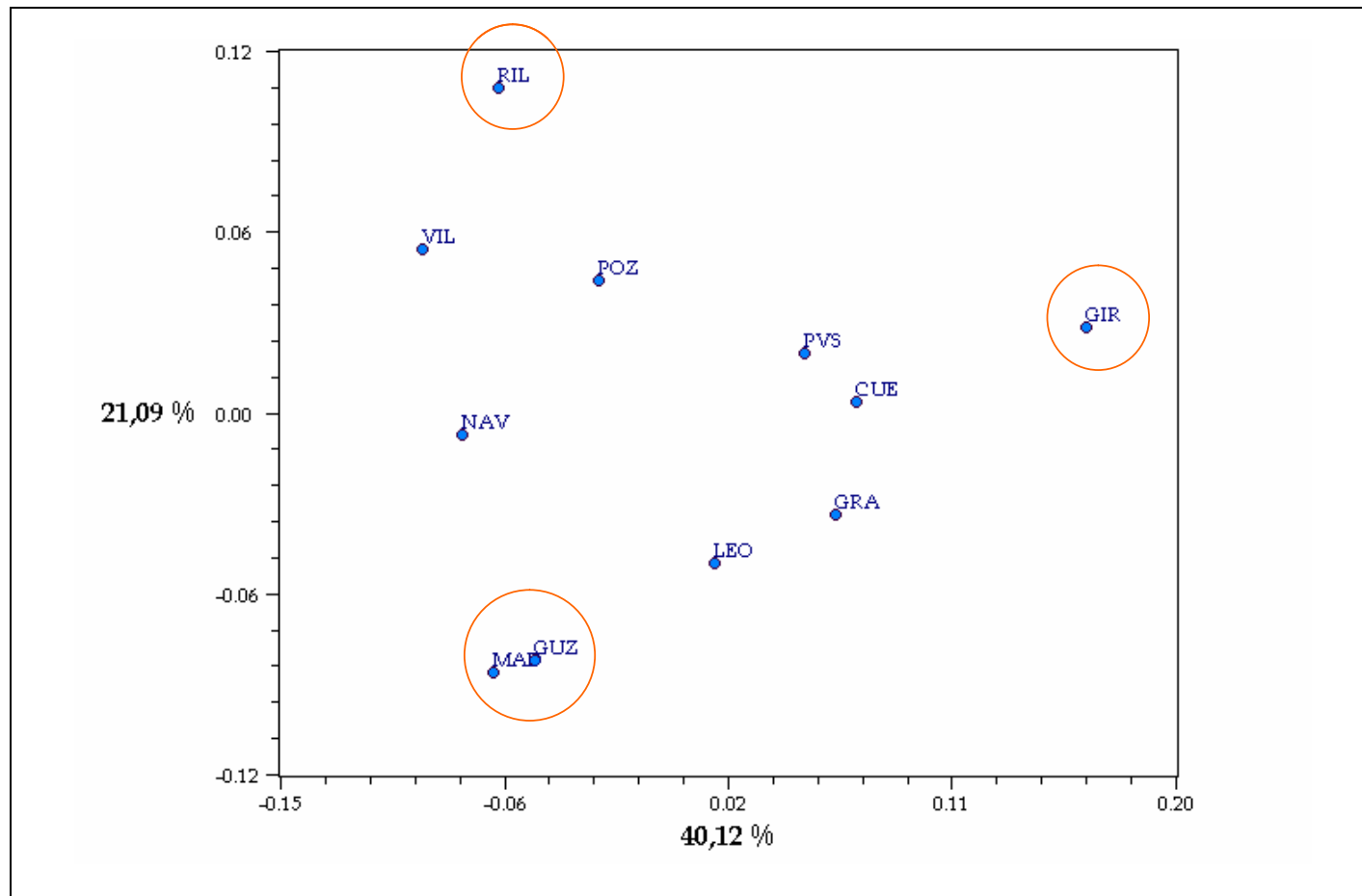


Figura 20. Representación gráfica en dos dimensiones del análisis de componentes principales de las 11 poblaciones españolas de *A. pallipes* estudiadas.

En el análisis correspondiente a los tres ejes el tercero de ellos absorbe el 18,72%. En conjunto, las 3 componentes principales explican el 79,93% de la varianza total, siendo necesarios 6 ejes para explicar el 100% de la misma (Figura 21). Continuamos observando, en primer lugar, la población de GIR (A. Santa Margarida) claramente diferenciada del resto y en segundo lugar, la población de la Astacifactoría, RIL, que aparece relativamente próxima a la población de VIL (A. Guadazaón), y el agrupamiento entre las poblaciones de GUZ (A. Guztar) y MAD (M. Madalena) se mantiene. Por último, el resto de las poblaciones podría admitir diversas agrupaciones.

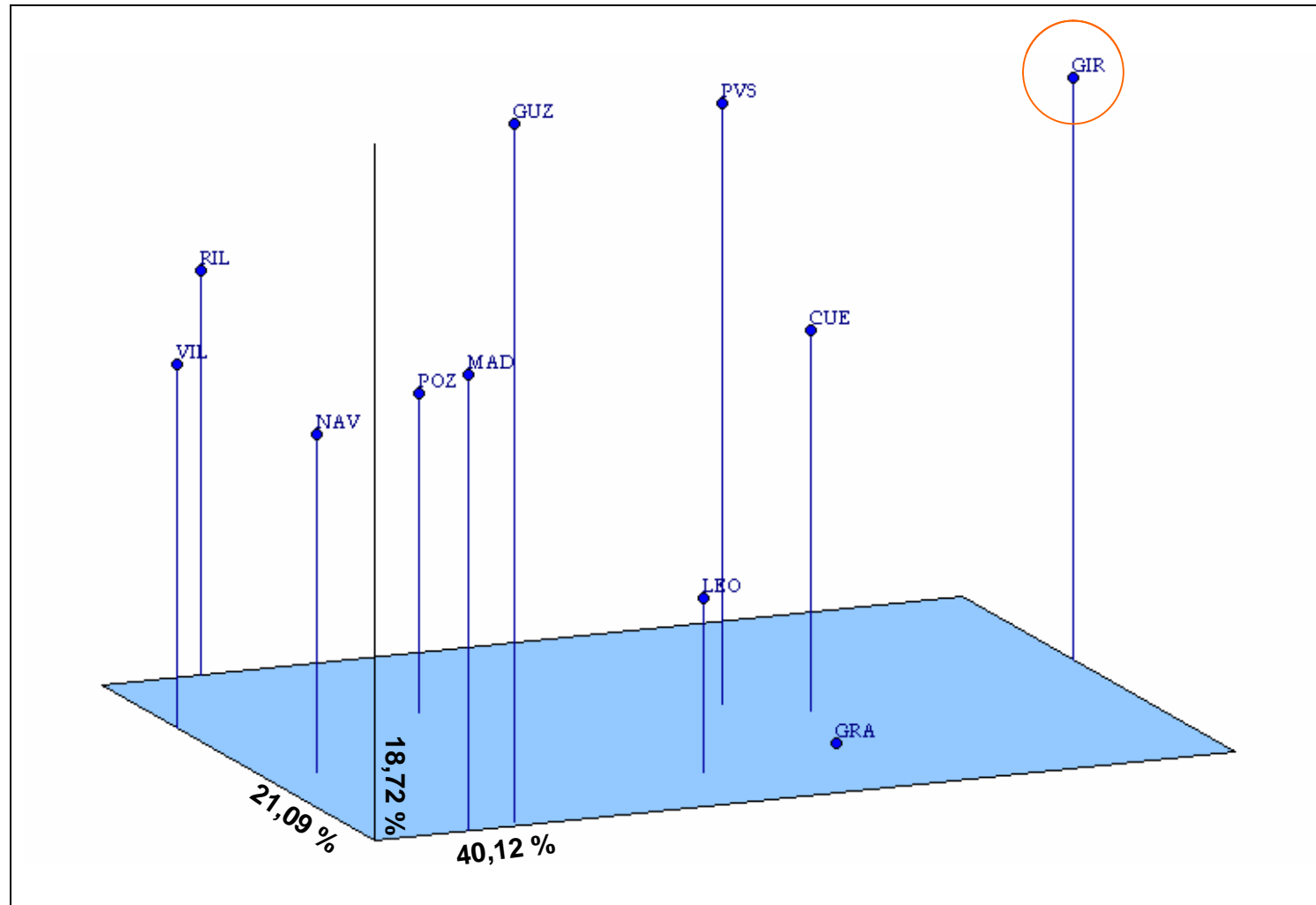


Figura 21. Representación gráfica en tres dimensiones del análisis de componentes principales de las 11 poblaciones españolas de *A. pallipes* estudiadas.

Por otra parte se ha realizado un análisis de componentes principales incluyendo la muestra de Italia, con la finalidad fundamental de conocer la situación de la misma respecto a las poblaciones españolas.

En primer lugar, en el análisis en dos dimensiones correspondiente a las doce poblaciones el primer eje absorbe un 78,46% de la varianza y el segundo el 15,66%, explicando entre los dos ejes prácticamente el 100% de la varianza (94,12) (Figura 22). En segundo lugar, en el análisis correspondiente a tres ejes, el tercero absorbe el 12,71% de la varianza (Figura 23). En la representación tanto de dos como de tres dimensiones se observan claramente dos agrupamientos, uno formado por la muestra de Italia, Coscile, y el otro por el resto de las poblaciones españolas.

Las relaciones de las poblaciones españolas entre sí, en este segundo análisis, resultan mucho menos relevantes que los datos anteriores, dado que sólo estamos considerando la información relativa a tres cebadores, mientras que la información total incluye diez cebadores. Por tanto, su poder discriminativo merece menor fiabilidad.

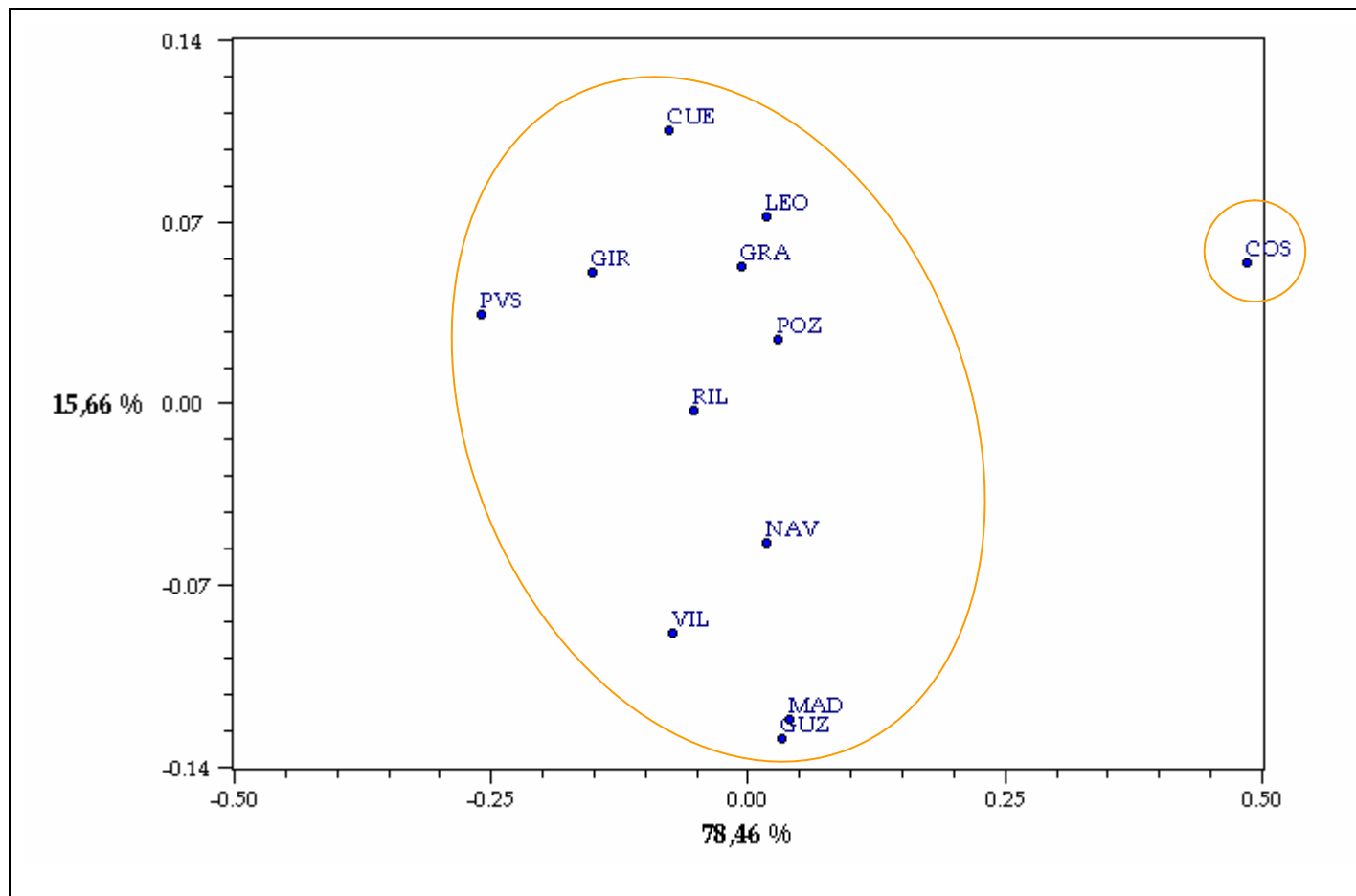


Figura 22. Representación gráfica en dos dimensiones del análisis de componentes principales de las 12 poblaciones (once españolas y una italiana) de A. pallipes estudiadas.

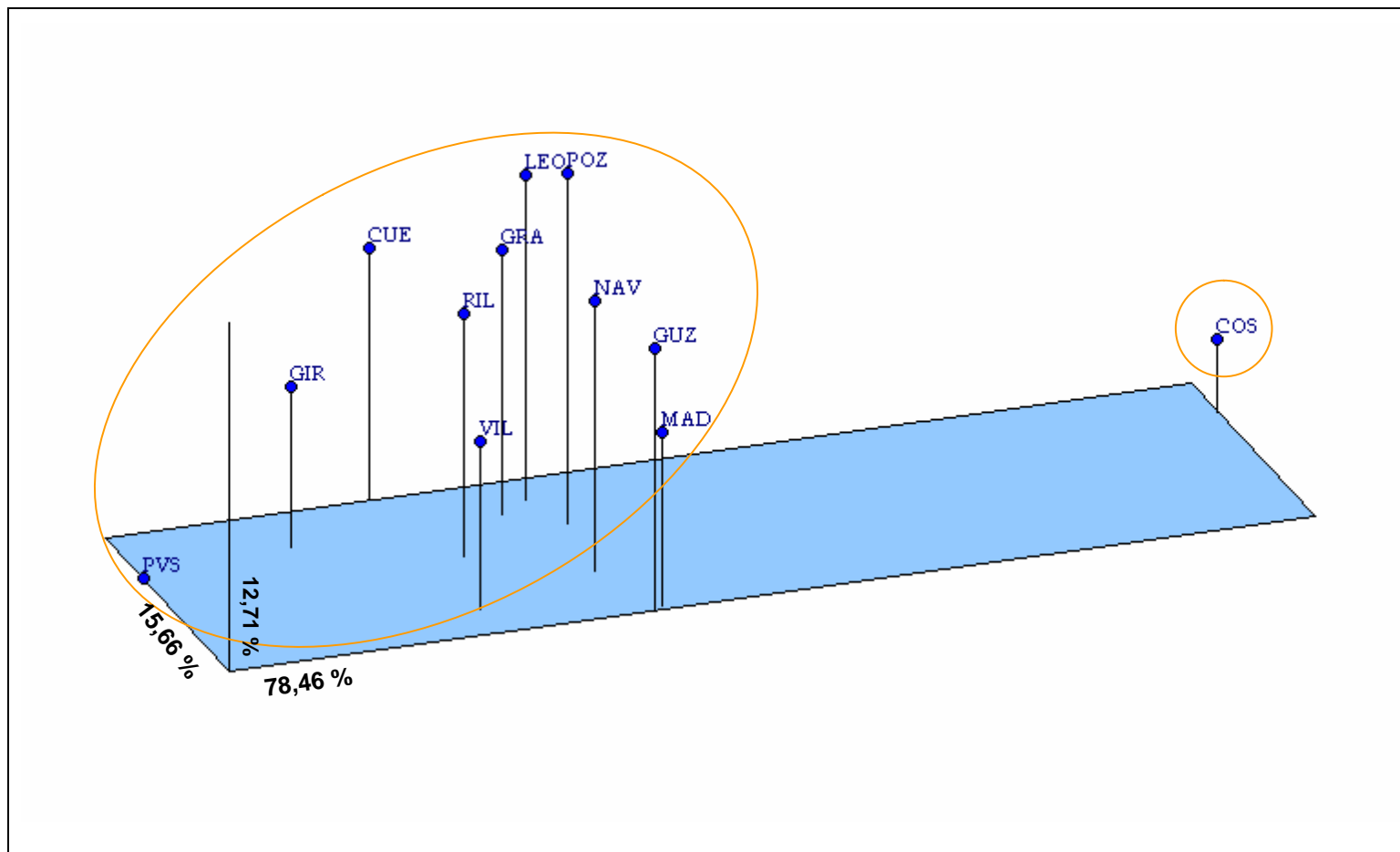


Figura 23. Representación gráfica en tres dimensiones del análisis de componentes principales de las 12 poblaciones (once españolas y una italiana) de *A. pallipes* estudiadas.

3.1.11 Construcción de dendrogramas

A partir de los índices de similitud y de las distancias genéticas de Nei (1972) se elaboraron tres dendrogramas mediante los métodos UPGMA y del vecino más próximo (NJ), por un lado para las once poblaciones españolas de *A. pallipes* y, por otro lado, para las doce poblaciones en su conjunto. Dado que en la bibliografía consultada el método del vecino más próximo (NJ) no se suele utilizar con los índices de similitud mientras que el método UPGMA se emplea tanto con los índices de similitud como con las distancias genéticas de Nei en la elaboración de los dendrogramas, hemos seguido el mismo criterio en nuestro trabajo.

El árbol elaborado a partir de los índices de similitud se muestra en la Figura 24 para las once poblaciones españolas del estudio. Y los elaborados a partir de las distancias genéticas de Nei se muestran en las Figuras 25 y 26.

En todos ellos se observa la población de GIR, del noreste peninsular, claramente separada del resto, y este resto lo constituyen dos grandes clados, uno con las poblaciones de CUE, GRA, LEO y PVS (con la excepción del dendrograma obtenido a partir de las distancias genéticas de Nei mediante el método del vecino más próximo (NJ) en el que la población de PVS se comporta de manera independiente del resto) y el otro con las demás poblaciones (RIL, VIL, GUZ, MAD, NAV y POZ). Existen, también, agrupaciones de poblaciones dos a dos que se repiten en los 3 tipos de dendrogramas: RIL y VIL, que corresponden a la Astacifactoría de Rillo y al río Júcar, respectivamente, las poblaciones de GUZ (Arroyo Guztar) y MAD (Manantial Madalena) y GRA y LEO, correspondientes al Arroyo Ermitas y Laguna de Valsemana.

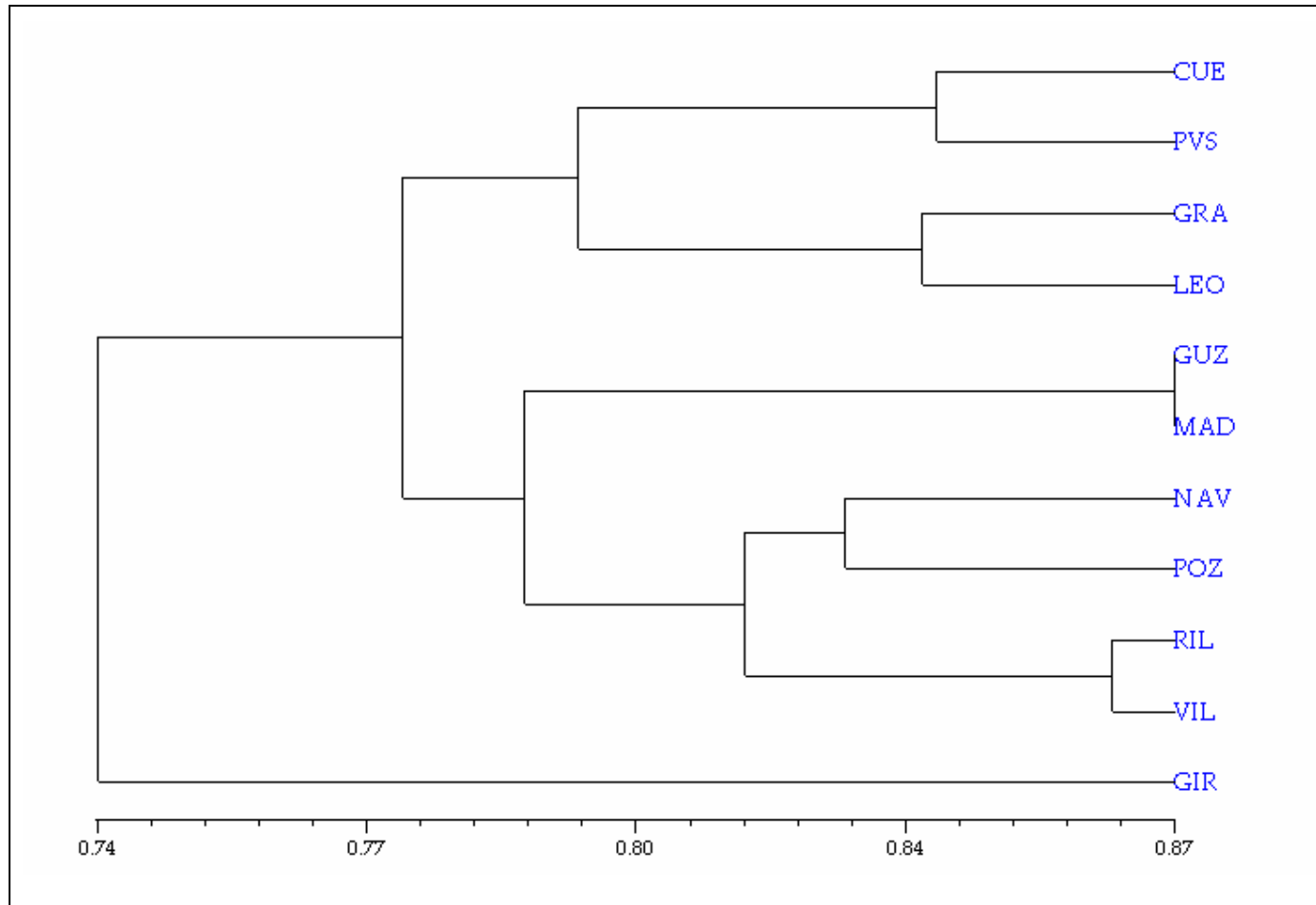


Figura 24. Dendrograma elaborado mediante el método UPGMA a partir de los índices de similitud interpoblacionales entre las once poblaciones españolas de *A. pallipes*.

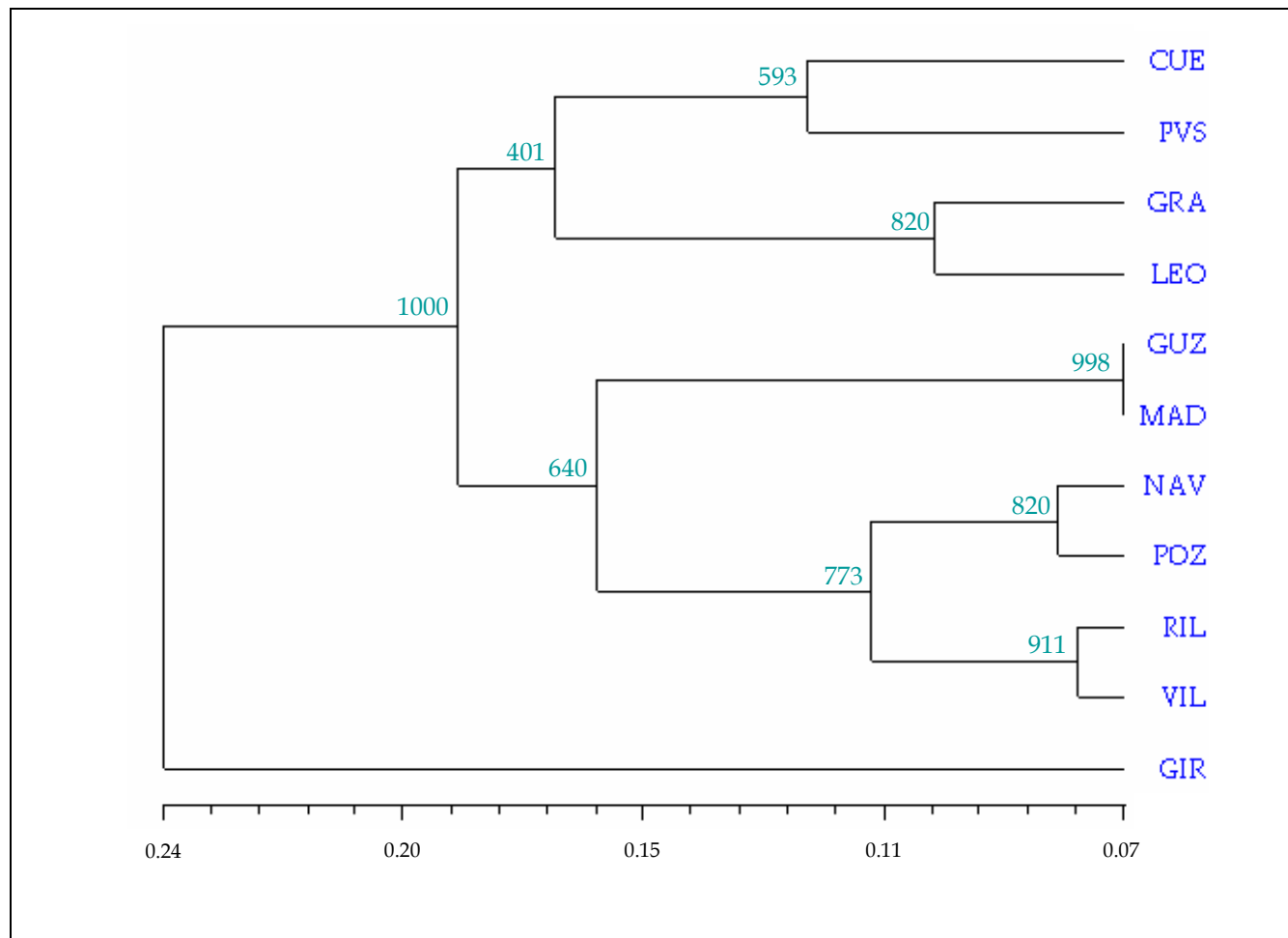


Figura 25. Dendrograma elaborado mediante el método UPGMA a partir de las distancias genéticas de Nei entre las once poblaciones españolas de *A. pallipes* analizadas.

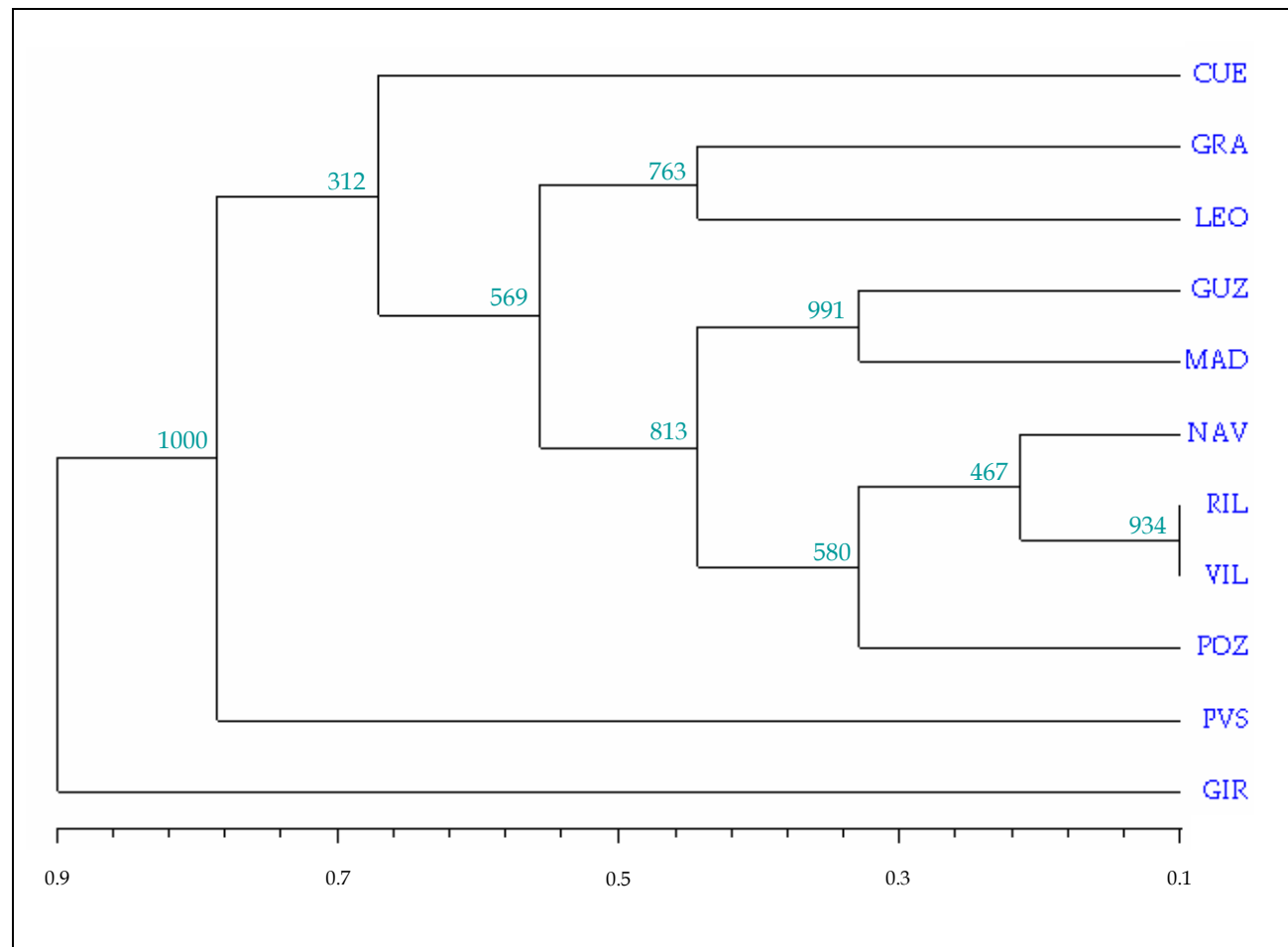


Figura 26. Dendrograma elaborado mediante el método NJ a partir de las distancias genéticas de Nei entre las once poblaciones españolas de *A. pallipes* analizadas.

Los resultados de los dendrogramas (Figuras 27, 28 y 29) al incluir la muestra del sur de Italia (COS) muestran dos clados, uno en el que se encuentra la población de Coscile (COS) y otro en el que aparecen agrupadas las once poblaciones españolas. La topología de la distribución de éstas es similar a la representada en los dendrogramas elaborados al considerar únicamente las poblaciones españolas, a partir de las distancias genéticas de Nei y de los índices de similitud mediante los métodos UPGMA y NJ (Figuras 24, 25 y 26).

Estos dendrogramas (Figuras 27, 28 y 29) contruidos fundamentalmente para establecer la relación relativa de la muestra de Italia con respecto a las poblaciones españolas, evidencian que, dicha muestra italiana, queda claramente separada del resto, independientemente del método y estadístico empleado. Y, en el caso de los árboles basados en las distancias genéticas de Nei se observan valores de *bootstrap* elevados. Las poblaciones españolas, aún cuando en la elaboración de estos árboles se han utilizado sólo tres cebadores (y, por consiguiente, su valor relativo puede resultar menos fiable) mantienen las características de la estrecha relación entre varios pares de poblaciones ya comentadas con anterioridad. Éstas son, por un lado, la Astacifactoría (RIL) y VIL, ambas del centro-este peninsular. Por otro lado, un par está conformado por las poblaciones de GUZ y MAD, situadas en la región centro-norte y, por último, las poblaciones de GRA y LEO.

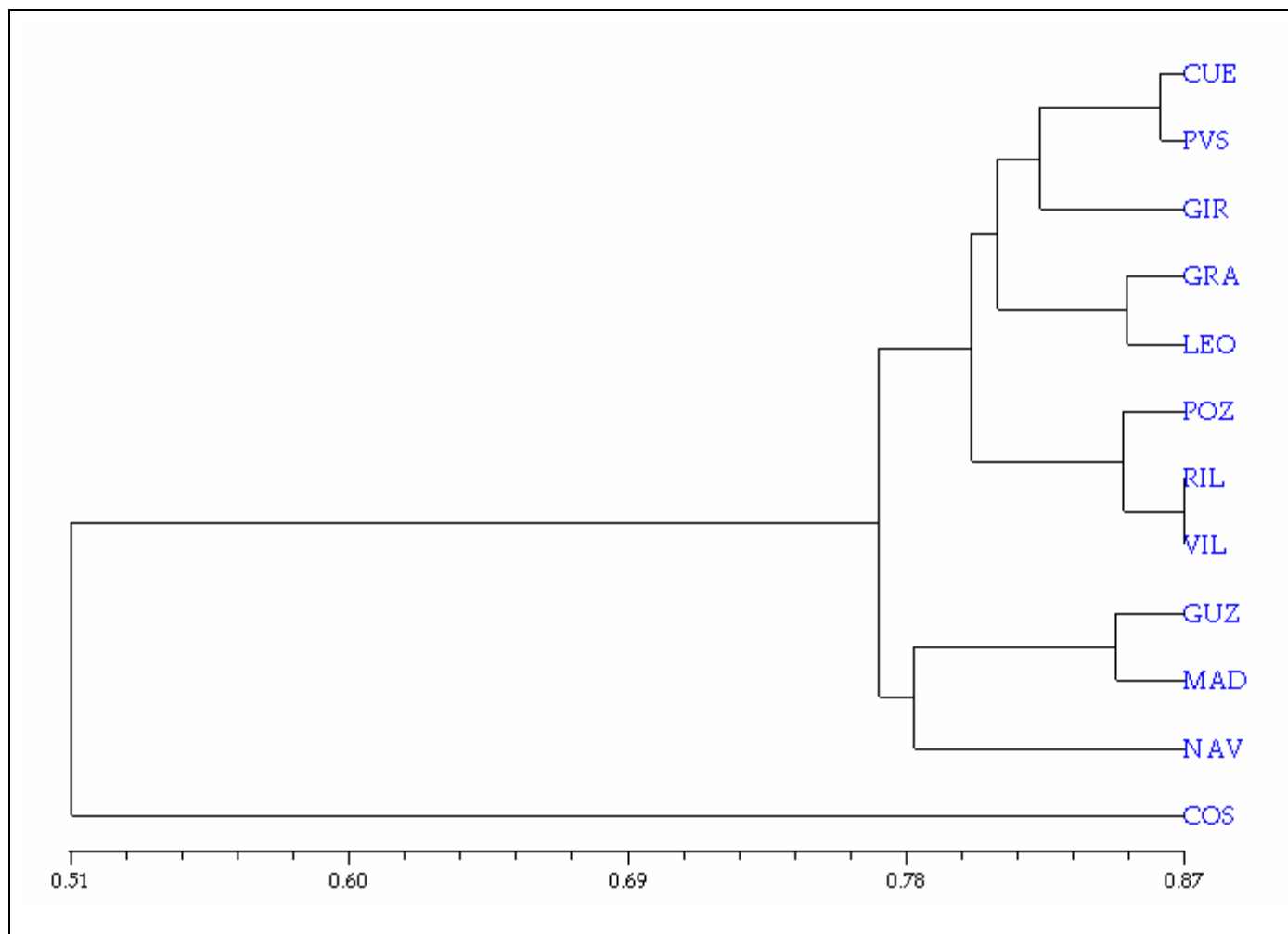


Figura 27. Dendrograma elaborado mediante el método UPGMA a partir de los índices de similitud entre las doce poblaciones de *A. pallipes* analizadas.

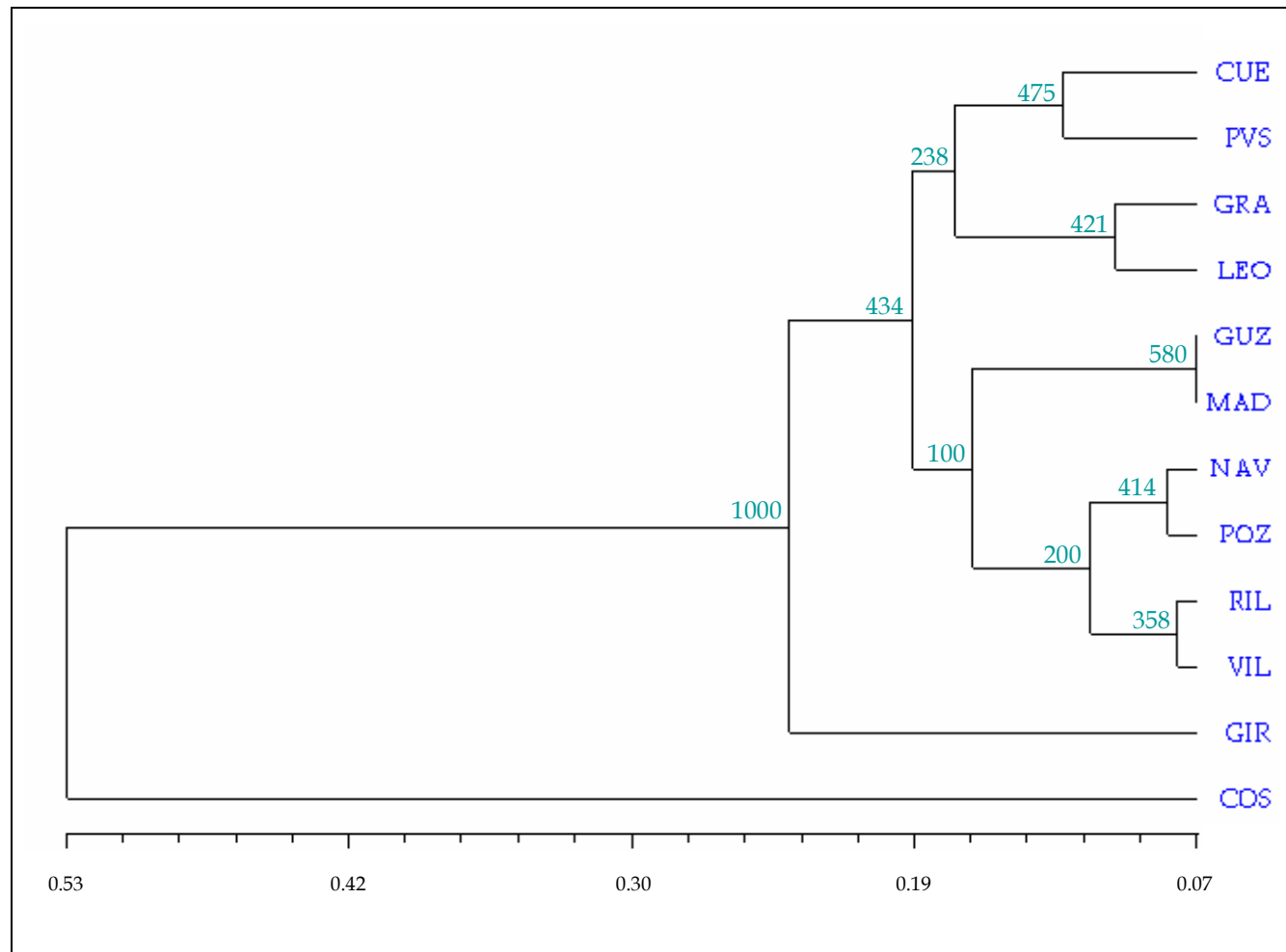


Figura 28. Dendrograma elaborado mediante el método UPGMA a partir de las distancias genéticas de Nei entre las doce poblaciones de *A. pallipes* analizadas.

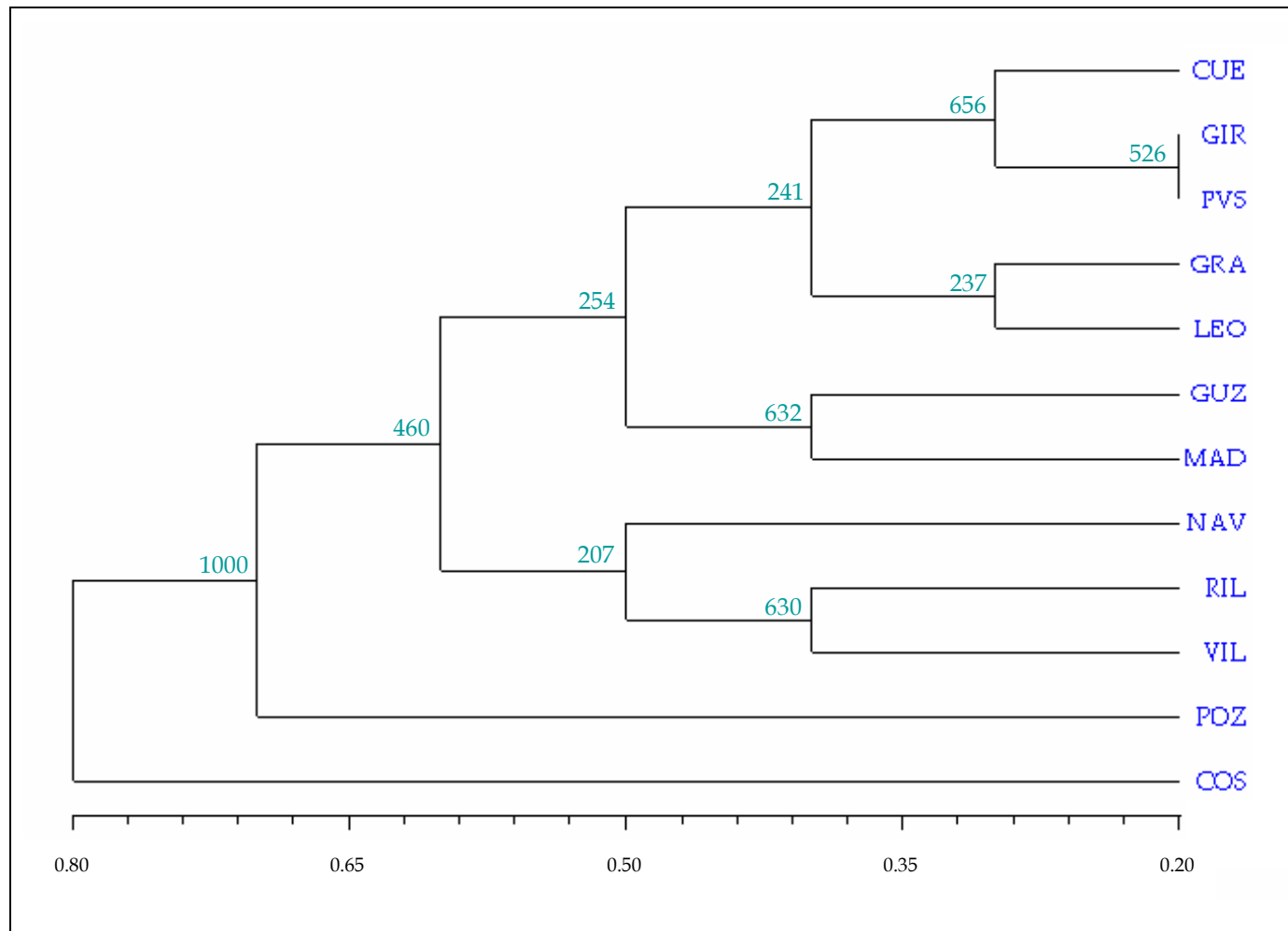


Figura 29. Dendrograma elaborado mediante el método NJ a partir de las distancias genéticas de Nei entre las doce poblaciones de *A. pallipes* analizadas.

3.2 ESTRUCTURA MORFOMÉTRICO-POBLACIONAL DE LA ESPECIE *Austropotamobius pallipes*

Para llevar a cabo el estudio morfométrico se han analizado 435 individuos pertenecientes a once poblaciones de la Península Ibérica, de los cuales 248 son machos (57%) y 187 hembras (43%). Como ya se ha comentado con anterioridad, el número de ejemplares no es exactamente el mismo para todas las poblaciones (ver Tabla 5).

3.2.1 Análisis descriptivo

En el Anexo 4 se recogen los datos morfométricos pormenorizados de todas las variables en las once poblaciones analizadas, y para cada individuo. Los promedios de las variables morfométricas para el conjunto de los individuos de *A. pallipes* en cada una de las once poblaciones españolas se muestran en la Tabla 46 para el conjunto de los individuos y en las Tablas 47 y 48 para los machos y las hembras. En los tres casos puede observarse cómo los valores más elevados corresponden a la población de la Astacifactoría (RIL).

Variable	CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	NAV	POZ	PVS	RIL	VIL
Peso	10,84	9,61	11,88	12,55	19,80	11,27	22,49	9,25	13,84	36,84	15,55
LCF	3,25	3,22	3,31	3,41	4,11	3,47	4,12	3,11	3,47	4,95	3,69
LT	6,51	6,42	7,05	7,14	8,64	7,09	8,47	6,32	7,11	9,81	7,50
ACF	1,69	1,68	1,83	1,84	2,03	1,87	2,35	1,69	1,82	2,79	1,98
LROS	0,94	1,04	0,97	1,08	1,16	1,03	1,20	0,89	1,09	1,43	1,09
ABASROS	0,53	0,55	0,56	0,59	0,68	0,59	0,68	0,54	0,60	0,81	0,61
ILPINZA	1,87	1,56	1,70	2,13	2,71	1,85	2,69	2,18	2,09	4,05	2,46
IAPINZA	0,64	0,56	0,65	0,91	1,03	0,63	1,20	0,86	0,80	1,62	1,01
DLPINZA	1,94	1,41	1,68	2,35	2,71	2,08	2,68	2,01	2,35	4,15	2,60
DAPINZA	0,68	0,45	0,67	1,03	1,02	0,80	1,17	0,74	0,97	1,63	1,08
IESP3MAX	3,98	5,25	6,98	6,80	6,37	6,13	6,63	4,93	3,90	6,76	5,29
DESP3MAX	3,70	5,13	6,85	7,05	6,17	6,25	6,74	4,90	3,75	6,64	5,06
IESPCER	1,68	1,83	2,27	2,03	3,27	2,17	2,89	1,32	3,06	1,95	2,83
DESPCER	1,60	1,88	2,12	2,20	3,24	2,17	2,96	1,54	2,96	2,12	2,94

Tabla 46. Valores promedio de las variables morfométricas del total de machos (248) y hembras (187) de *A. pallipes* analizados en cada una de las once poblaciones españolas.

Variable	CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	NAV	POZ	PVS	RIL	VIL
Peso	7,54	7,91	10,52	10,77	16,94	-	19,06	6,04	11,40	28,72	13,14
LCF	3,10	3,13	3,25	3,34	3,99	-	4,03	2,84	3,45	4,89	3,54
LT	6,13	6,30	6,97	7,04	8,67	-	8,43	5,93	7,23	9,92	7,39
ACF	1,60	1,63	1,77	1,76	1,95	-	2,29	1,49	1,68	2,73	1,89
LROS	1,05	1,02	0,93	1,10	1,16	-	1,20	0,82	1,12	1,46	1,03
ABASROS	0,54	0,51	0,55	0,58	0,68	-	0,67	0,51	0,61	0,82	0,59
ILPINZA	1,44	0,97	1,37	2,01	2,27	-	2,20	1,56	1,95	3,18	2,08
IAPINZA	0,48	0,28	0,49	0,92	0,91	-	0,97	0,61	0,79	1,31	0,87
DLPINZA	1,47	0,97	1,38	1,80	2,19	-	2,12	1,55	1,80	3,05	2,15
DAPINZA	0,50	0,28	0,54	0,79	0,84	-	0,93	0,59	0,68	1,21	0,88
IESP3MAX	3,69	5,18	7,08	6,60	6,10	-	6,31	4,31	5,15	6,59	4,72
DESP3MAX	3,69	4,82	6,92	6,53	6,00	-	6,38	4,50	4,85	6,29	4,56
IESPCER	2,06	2,05	2,36	2,13	3,33	-	3,25	1,31	3,20	2,12	2,83
DESPCER	1,94	2,14	2,20	2,27	3,48	-	3,31	1,38	3,15	2,29	3,00

Tabla 47. Valores promedio de las variables morfométricas del total de hembras de *A. pallipes* analizadas (187 individuos procedentes de once poblaciones españolas).

Variable	CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	NAV	POZ	PVS	RIL	VIL
Peso	13,05	11,69	14,01	13,62	22,79	11,36	27,48	11,30	15,58	42,37	18,10
LCF	3,35	3,34	3,42	3,45	4,23	3,48	4,24	3,28	3,48	4,98	3,85
LT	6,76	6,57	7,17	7,19	8,61	7,11	8,53	6,57	7,02	9,74	7,61
ACF	1,76	1,74	1,93	1,89	2,11	1,88	2,44	1,82	1,93	2,84	2,08
LROS	0,87	1,06	1,03	1,07	1,17	1,03	1,20	0,94	1,07	1,41	1,16
ABASROS	0,53	0,59	0,58	0,59	0,68	0,59	0,70	0,56	0,59	0,80	0,63
ILPINZA	2,16	2,29	2,21	2,21	3,18	1,85	3,41	2,58	2,18	4,64	2,86
IAPINZA	0,74	0,89	0,91	0,90	1,15	0,63	1,54	1,02	0,81	1,83	1,16
DLPINZA	2,25	1,95	2,15	2,69	3,27	2,10	3,49	2,30	2,74	4,90	3,07
DAPINZA	0,80	0,65	0,89	1,18	1,21	0,80	1,52	0,84	1,18	1,92	1,28
IESP3MAX	4,17	5,33	6,81	6,92	6,65	6,21	7,09	5,32	3,00	6,88	5,88
DESP3MAX	3,71	5,50	6,75	7,36	6,35	6,28	7,27	5,16	2,96	6,88	5,59
IESPCER	1,42	1,56	2,13	1,96	3,20	2,18	2,36	1,32	2,96	1,84	2,82
DESPCER	1,38	1,56	2,00	2,16	3,00	2,18	2,45	1,64	2,82	2,00	2,88

Tabla 48. Valores promedio de las variables morfométricas del total de machos de *A. pallipes* analizados (248 individuos procedentes de once poblaciones españolas).

De cada una de las variables morfométricas y para el conjunto de los individuos se ha analizado la tendencia central y la dispersión de los valores utilizando la media, mediana, moda, desviación típica, varianza, asimetría, curtosis, máximo y mínimo (Tablas 49, 50 y 51).

Variable	\bar{X}	Mediana	Moda	σ	σ^2	Asimetría	Curtosis	Mínimo	Máximo
Peso	15,70	12,19	7,60	10,79	116,44	1,39	1,68	1,70	63,20
LCF	3,64	3,54	3,10	0,74	0,54	0,35	-0,31	1,80	5,80
LT	7,45	7,27	7,20	1,46	2,16	-0,3	0,25	0,74	11,32
ACF	1,96	1,90	1,70	0,46	0,21	0,48	0,23	0,78	3,85
LROS	1,11	1,10	1,00	0,20	0,04	0,28	1,19	0,19	1,85
ABASROS	0,62	0,62	0,60	0,11	0,01	0,30	-0,18	0,37	1,02
ILPINZA	2,56	2,32	2,00	1,00	1,00	0,98	0,51	0,97	5,80
IAPINZA	1,04	0,95	0,90	0,43	0,18	0,85	0,49	0,09	2,71
DLPINZA	2,55	2,31	2,00	1,02	1,05	0,97	0,49	0,76	5,98
DAPINZA	1,03	0,94	0,60	0,43	0,18	0,79	0,12	0,26	2,31
IESP3MAX	5,95	6,00	6,00	1,53	2,36	-0,36	0,12	1,00	9,00
DESP3MAX	5,86	6,00	6,00	1,65	2,75	-0,28	0,27	1,00	12,00
IESPCER	2,30	2,00	2,00	1,10	1,21	0,86	0,79	1,00	7,00
DESPCER	2,35	2,00	2,00	1,15	1,33	1,46	6,69	1,00	11,00

Tabla 49. Descriptiva de las variables morfométricas del total de individuos (248 machos y 187 hembras) de *A. pallipes* analizados procedentes de once poblaciones españolas.

Variable	\bar{X}	Mediana	Moda	σ	σ^2	Asimetría	Curtosis	Mínimo	Máximo
Peso	13,11	10,83	7,60 ^a	8,22	67,65	1,26	1,80	1,65	49,55
LCF	3,54	3,43	2,80 ^a	7,39	54,75	0,43	-0,08	1,78	5,84
LT	7,43	7,26	6,00 ^a	15,23	232,13	0,17	-0,67	3,87	11,32
ACF	1,91	1,85	1,50 ^a	4,70	22,17	0,24	-0,39	0,78	3,25
LROS	1,10	1,74	1,07	2,24	5,04	0,25	1,98	0,19	1,85
ABASROS	0,62	0,62	0,60	1,17	1,37	0,28	0,00	0,32	1,02
ILPINZA	2,10	1,97	7,00	6,75	45,63	0,96	0,99	0,97	4,63
IAPINZA	0,87	0,85	6,00	3,16	10,04	0,67	0,17	0,32	1,89
DLPINZA	2,08	1,94	2,00	6,76	45,74	0,96	1,05	0,76	4,45
DAPINZA	0,86	0,82	0,70 ^a	3,07	9,44	0,68	0,13	0,26	1,74
IESP3MAX	5,68	6,00	1,62	1,58	2,52	-0,37	-0,18	1,00	9,00
DESP3MAX	5,56	6,00	0,60	1,59	2,55	-0,21	-0,15	1,00	9,00
IESPCER	2,50	2,00	2,00	1,09	1,20	0,75	0,99	1,00	7,00
DESPCER	2,54	2,00	2,00	1,09	1,20	0,43	-0,07	1,00	6,00

Tabla 50. Descriptiva de las variables morfométricas del total de las hembras de *A. pallipes* analizadas (187 individuos procedentes de once poblaciones españolas).

a: existen varias modas, se muestra el menor de los valores.

Variable	\bar{X}	Mediana	Moda	σ	σ^2	Asimetría	Curtosis	Mínimo	Máximo
Peso	17,64	13,06	13,40	12,02	144,61	1,20	0,78	2,07	63,21
LCF	3,72	3,57	3,10	7,35	54,03	0,32	-0,45	1,99	5,71
LT	7,50	7,330	5,78 ^a	13,69	187,67	0,18	-0,44	4,00	10,83
ACF	2,05	1,95	1,90	4,65	21,68	0,50	0,19	1,01	3,85
LROS	1,12	1,10	1,00	1,91	3,65	0,52	0,21	0,70	1,69
ABASROS	0,62	0,62	0,57	1,07	1,15	0,23	-0,29	0,38	0,92
ILPINZA	2,91	2,65	6,00	10,70	114,58	0,69	-0,27	1,00	5,80
IAPINZA	1,17	1,07	7,00	4,61	21,29	0,63	-0,06	0,90	2,71
DLPINZA	2,89	2,55	2,30	11,00	121,19	0,65	-0,31	0,89	5,98
DAPINZA	1,16	1,05	0,90	4,62	21,40	0,52	-0,46	0,30	2,31
IESP3MAX	6,15	6,00	2,16	1,46	2,16	-0,31	0,37	1,00	9,00
DESP3MAX	6,08	6,00	0,92	1,67	2,79	-0,38	0,71	1,00	12,00
IESPCER	2,14	2,00	2,00	1,08	1,17	1,00	0,85	1,00	6,00
DESPCER	2,15	2,00	2,00	1,03	1,08	0,86	0,51	1,00	6,00

Tabla 51. Descriptiva de las variables morfométricas del total de machos *A. pallipes* analizados (248 individuos de once poblaciones españolas).

a: existen varias modas, se muestra el menor de los valores.

3.2.2 Estudio descriptivo de normalidad

Para llevar a cabo el estudio descriptivo de normalidad hemos utilizado dos estadísticos, el coeficiente de curtosis y el de asimetría. Si las variables tuvieran la forma de una distribución Normal, tanto el coeficiente de curtosis como el de asimetría deberían ser próximos a cero. Hemos examinado los datos de cada variable, separados por sexos, de todas las poblaciones en su conjunto y de cada población por separado. Como puede apreciarse en las Tablas 49, 50 y 51, en las columnas correspondientes a los estadísticos asimetría y curtosis, sólo cuatro variables, longitud total en hembras (LT), longitud de cefalotórax en hembras (LCF), anchura de cefalotórax en hembras (ACF) y anchura de la base del rostro en machos y hembras (ABASROS) se ajustan a una distribución normal.

3.2.3 Transformación logarítmica de los datos

Puesto que nuestros datos no cumplen el requisito de la normalidad hemos optado por el empleo de análisis paramétricos transformando la variable, con el fin de cumplir los tres supuestos básicos para la aplicación de pruebas paramétricas, homogeneidad de varianzas (homocedasticidad), normalidad e independencia de las muestras.

Puesto que los valores de nuestras variables son sesgados positivamente hemos elegido la transformación logarítmica. Tras llevarla a cabo observamos que todas las variables separadas por sexos (machos, hembras) y en su conjunto (machos y hembras), cumplen el requisito de la normalidad excepto el número de espinas (tanto las cervicales como las del tercer maxilípodo) hecho que no resulta llamativo puesto que se trata de conteos.

3.2.4 Test t de Student y prueba de Mann-Whitney

Por medio del test t de Student y de la prueba de Mann-Whitney hemos comparado las medias entre machos y hembras, lo que nos permitirá establecer diferencias entre distintos grupos. En la Tabla 52 observamos que existen diferencias entre machos y hembras en la mayoría de las variables, a excepción de la longitud total (LT) y las dos medidas referidas al rostro (LROS, ABASROS), lo que nos indica que las diferencias no son debidas al tamaño de los individuos. Las diferencias entre ambos sexos nos han llevado a separar, hembras por un lado y machos por otro, al realizar los siguientes análisis estadísticos.

Variable	t	p	U	p
Peso	-4,2455	***	17975,0	***
LCF	-2,6722	**	19650,0	**
LT	-0,7378	ns	22009,5	ns
ACF	-3,1427	**	19214,0	**
LROS	-1,3869	ns	21921,0	ns
ABASROS	-0,5663	ns	22421,0	ns
ILPINZA	-8,9119	***	10308,0	***
IAPINZA	-7,0241	***	12130,5	***
DLPINZA	-8,5846	***	10796,5	***
DAPINZA	-7,2599	***	1236,0	***
IESP3MAX	-3,1492	**	18191,0	**
DESP3MAX	-3,2712	**	17423,0	***
IESPCER	3,4012	***	18355,0	***
DESPCER	3,7181	***	18124,5	***

Tabla 52. Análisis t de Student y U de Mann-Whitney de las variables morfométricas para todas las poblaciones en su conjunto.

*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ns: no significativo

Puesto que disponemos de los datos sin transformar y transformados logarítmicamente hacemos las comparaciones mediante los dos tests, *t* de Student (datos transformados) y *U* de Mann-Whitney (datos sin transformar).

3.2.5 Análisis MLG univariante

Hemos empleado el análisis MLG univariante ajustando la diferencia en la longitud total (LT) para poder hacer comparables las distintas poblaciones (cuencas y vertientes) de *A. pallipes*. Se ha calculado cuál sería el valor de cada una de las variables previsto por la ecuación de regresión para la media global de longitud total (LT) y se ha determinado el valor de dichas variables a partir de la ecuación de regresión en cada población (cuenca y vertiente). Este valor se denomina “medias ajustadas” y son aquellas que

obtendríamos si en todas las poblaciones se hubiese observado la misma longitud total (LT) en sus individuos.

Hemos encontrado diferencias en las variables dependientes (LCF, ACF, LROS, ABASROS, ILPINZA, IAPINZA, DLPINZA, DAPINZA) en función de la población de la que se trate, tanto en el caso de los machos como en el de las hembras.

En la Tabla 53 se muestra, para los machos de *A. pallipes*, en qué poblaciones son diferentes las variables y cuándo son mayores o menores que la media. En las poblaciones de A. Ermitas (GRA), L. Valsemana (LEO) y M. Madalena (MAD), todas las variables estadísticamente significativas son menores que la media. Lo contrario sucede en el caso de las poblaciones del R. Nervión (PVS), Astacifactoría (RIL) y A. Guadazaón (VIL), donde las variables morfométricas diferentes son mayores que la media. En otras poblaciones las variables estadísticamente significativas no siguen el mismo comportamiento en todos los casos. Así sucede en la población de A. Cuende (CUE) donde la longitud del rostro (LROS) está por encima de la media pero la anchura de la pinza izquierda (IAPINZA) se encuentra por debajo. En el A. Guztar (GUZ) las anchuras de pinzas (IAPINZA, DAPINZA) son mayores que la media mientras que la longitud del cefalotórax (LCF) es menor. Y por último, en el A. Pozuelo (POZ) la longitud de las pinzas (ILPINZA, DLPINZA) y anchura de cefalotórax (ACF) es superior y la longitud del rostro (LROS) menor que la media. La población de Gerona (GIR) no presenta ninguna variable estadísticamente diferente.

En la Tabla 54 se muestran los resultados para las hembras. Se observa que todas las variables estadísticamente significativas presentan valores inferiores a la media en las poblaciones de A. Ermitas (GRA), L. Valsemana (LEO), igual que para el caso de los machos, y en A. Pozuelo (POZ) y R. Guadazaón (VIL). En el A. Guztar (GUZ), R. Ega (NAV) y Astacifactoría (RIL) las variables estadísticamente diferentes son mayores que la media.

Sólo en el A. Cuende (CUE) la longitud del rostro (LROS) es mayor y la anchura de pinza (IAPINZA) menor que el valor medio global. Del mismo modo que en el análisis de los machos, la población del A. Santa Margarida (GIR) no presenta ninguna variable estadísticamente significativa.

En ambos análisis, machos y hembras, tres poblaciones siguen el mismo comportamiento. Por un lado, en las poblaciones de GRA (A. Ermitas) y LEO (L. Valsemana) todas las variables estadísticamente significativas son menores que la media. Y, por el contrario, en la población de la Astacifactoría (RIL) todas las variables estadísticamente significativas son superiores a la media.

CUE											
GIR	LCF ABASROS ILPINZA IAPINZA										
GRA	LCF LROS IAPINZA DLPINZA	LCF LROS ABASROS ILPINZA IAPINZA									
GUZ	LCF LROS IAPINZA DAPINZA	LCF LROS ABASROS ILPINZA DAPINZA	ILPINZA IAPINZA DLPINZA DAPINZA								
LEO	LROS ABASROS ILPINZA IAPINZA DLPINZA DAPINZA	LCF LROS ABASROS ILPINZA IAPINZA DLPINZA DAPINZA	ILPINZA IAPINZA DAPINZA	LCF LROS ILPINZA IAPINZA DLPINZA DAPINZA							
MAD	LROS	LCF LROS ABASROS ILPINZA IAPINZA DLPINZA	LCF DLPINZA	LCF LROS ILPINZA IAPINZA DLPINZA DAPINZA	ILPINZA IAPINZA DAPINZA						
NAV	ACF LROS ILPINZA IAPINZA DAPINZA	LCF ACF LROS ABASROS ILPINZA	ACF LCF IAPINZA DLPINZA DAPINZA	ACF LCF ILPINZA	ACF ABASROS ILPINZA IAPINZA DLPINZA DAPINZA	ACF IAPINZA DAPINZA					
POZ	ACF LROS IAPINZA DLPINZA DAPINZA	ACF LROS ABASROS	LCF IAPINZA DLPINZA DAPINZA	LCF LROS DLPINZA	LCF ABASROS IAPINZA DLPINZA DAPINZA	LCF IAPINZA DLPINZA DAPINZA	ILPINZA DLPINZA				
PVS	LCF IAPINZA DLPINZA	LCF ABASROS DAPINZA	LCF LROS ABASROS IAPINZA DLPINZA DAPINZA	LCF LROS ILPINZA DLPINZA	LCF LROS ABASROS ILPINZA IAPINZA DLPINZA DAPINZA	LROS ILPINZA IAPINZA DLPINZA DAPINZA	LROS ILPINZA DLPINZA	LROS DAPINZA			
RIL	LCF ACF IAPINZA DLPINZA DAPINZA	ACF DLPINZA DAPINZA	ACF LCF ABASROS IAPINZA DLPINZA DAPINZA	ACF LCF ABASROS IAPINZA DLPINZA	ACF LCF ABASROS IAPINZA DLPINZA DAPINZA	ACF LCF ABASROS IAPINZA DLPINZA DAPINZA	LCF LROS ILPINZA DLPINZA	LROS IAPINZA	ACF LCF IAPINZA DLPINZA		
VIL	IAPINZA DLPINZA DAPINZA	ILPINZA IAPINZA DAPINZA	ACF LCF LROS DLPINZA DAPINZA	ACF LCF ILPINZA IAPINZA	ACF LCF LROS ABASROS ILPINZA IAPINZA DLPINZA DAPINZA	ACF LCF LROS ILPINZA IAPINZA DLPINZA DAPINZA	ACF LCF LROS IAPINZA DLPINZA	ACF LROS ILPINZA	LROS ILPINZA IAPINZA	ACF IAPINZA DLPINZA	
	CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	NAV	POZ	PVS	RIL	VIL

Tabla 53. ANCOVA de los ejemplares macho de las once poblaciones españolas analizadas de *A.pallipes*.

CUE											
GIR	ABASROS IAPINZA										
GRA	LCF LROS	LROS									
GUZ	IAPINZA DAPINZA	ABASROS IAPONZA DAPINZA	LROS ABASROS ILPINZA IAPINZA DLPINZA DAPINZA								
LEO	ACF LROS	ACF LROS ABASROS ILPINZA IAPINZA	ACF ABASROS IAPINZA	ACF LROS ABASROS ILPINZA IAPINZA DAPINZA							
MAD	LCF IAPINZA DLPINZA	LCF	LCF LROS		ACF LROS ABASROS ILPINZA IAPINZA						
NAV	ACF LROS ABASROS IAPINZA DAPINZA	ACF ABASROS IAPINZA	ACF ABASROS IAPINZA DAPINZA	ACF LCF	ACF LROS ILPINZA IAPINZA DAPINZA						
POZ	LCF LROS	LCF LROS ABASROS	LROS ABASROS	LCF IAPINZA DAPINZA	ACF		LCF ACF LROS IAPINZA DAPINZA				
PVS	ACF ILPINZA IAPINZA		LROS ILPINZA DLPINZA	ABASROS ILPINZA	ACF LROS ABASROS ILPINZA IAPINZA DLPINZA	LCF DLPINZA	ACF ABASROS	LCF LROS ILPINZA IAPINZA DAPINZA			
RIL	LCF ACF ABASROS ILPINZA IAPINZA DAPINZA	LCF LROS IAPINZA DLPINZA DAPINZA	LCF ACF LROS ABASROS ILPINZA IAPINZA DLPINZA DAPINZA	LCF LROS ABASROS ILPINZA IAPINZA DLPINZA	LCF ACF LROS ILPINZA IAPINZA DLPINZA DAPINZA	LCF ABASROS IAPINZA	LROS ABASROS ILPINZA IAPINZA DLPINZA	LCF ACF LROS ABASROS ILPINZA IAPINZA DLPINZA DAPINZA	LCF ACF LROS ABASROS ILPINZA IAPINZA DLPINZA DAPINZA		
VIL	LROS ABASROS IAPINZA	LROS ABASROS	LCF ABASROS DLPINZA	ACF LROS IAPINZA	ACF IAPINZA DLPINZA DAPINZA		ACF LROS IAPINZA	LCF LROS DAPINZA	LROS ABASROS	LCF ACF LROS ABASROS ILPINZA IAPINZA DLPINZA DAPINZA	
	CUE	GIR	GRA	GUZ	LEO	MAD	NAV	POZ	PVS	RIL	VIL

Tabla 54. ANCOVA de los ejemplares hembra de las once poblaciones españolas analizadas de *A.pallipes*.

A continuación se analizaron, en primer lugar los machos y en segundo lugar las hembras, agrupados por cuencas (Tablas 55 y 56). En ambos casos todas las variables dependientes (LCF, ACF, LROS, ABASROS, ILPINZA, IAPINZA, DLPINZA, DAPINZA) resultaron diferentes estadísticamente dependiendo de la cuenca a la que pertenecieran. Podemos observar que el comportamiento en ambos sexos es prácticamente similar atendiendo a las cuencas.

Por un lado, encontramos la Astacifactoría de Rillo de Gallo (RIL), donde las variables son estadísticamente más elevadas que la media, resultado similar al análisis por poblaciones. La cuenca costero-catalana (GIR) no presenta ninguna variable significativa. En las cuencas del Duero (LEO, L. Valsemana y MAD, M. Madalena) y Guadalquivir (GRA, A. Ermitas) todas las variables son estadísticamente inferiores a la media en ambos sexos.

Por otro lado, en la cuenca del Ebro (NAV, R. Ega y GUZ, A. Guztar) y Guadiana (CUE, A. Cuende) las variables siguen un comportamiento similar en machos y hembras, con alguna variación. Así, en la cuenca del Ebro las pinzas (IAPINZA, DAPINZA) toman valores por encima de la media, la longitud del cefalotórax (LCF) es menor en el caso de los machos, mientras que la anchura de la base del rostro (ABASROS) sólo para las hembras. Y en la cuenca del Guadiana, a la longitud del rostro (LROS) y anchura de pinza (IAPINZA), mayor y menor respectivamente, se le añade la longitud de pinza (ILPINZA) en los machos únicamente.

Las cuencas del Júcar y Tajo siguen comportamientos diferentes en ambos sexos. En la del Júcar, sólo las hembras presentan las variables morfométricas del rostro (LROS y ABASROS) por debajo de la media. Y en la cuenca del Tajo, la única variable menor en ambos sexos es la longitud del rostro (LROS); anchura de cefalotórax (ACF) y longitud de pinzas (ILPINZA,

DLPINZA) toman valores por encima de la media en los machos y longitud de cefalotórax (LCF) por debajo en las hembras.

Del mismo modo que en el análisis por poblaciones, en la Astacifactoría (RIL) todas las variables estadísticamente significativas son superiores a la media.

NERVIÓN								
CATALANA	LCF ABASROS DAPINZA							
DUERO	ACF LROS ABASROS ILPINZA IAPINZA DLPINZA DAPINZA	LCF ACF LROS ABASROS ILPINZA IAPINZA DLPINZA						
EBRO	LCF LROS ILPINZA DLPINZA	LCF LROS ILPINZA DAPINZA	LROS ILPINZA IAPINZA DLPINZA DAPINZA					
GUADALQUIVIR	LCF LROS ABASROS ILPINZA IAPINZA DAPINZA	LCF LROS ABASROS ILPINZA DLPINZA	LCF ACF IAPINZA	ILPINZA IAPINZA DLPINZA DAPINZA				
GUADIANA	ACF ILPINZA IAPINZA DLPINZA DAPINZA	LCF ABASROS ILPINZA IAPINZA DAPINZA	LCF ACF LROS ILPINZA DLPINZA	LCF LROS IAPINZA DAPINZA	LCF LROS IAPINZA DLPINZA			
JUCAR	LROS ILPINZA IAPINZA	ABASROS ILPINZA IAPINZA DAPINZA	LCF ACF LROS ILPINZA IAPINZA DLPINZA DAPINZA	LCF ACF ILPINZA IAPINZA	LCF LROS DLPINZA DAPINZA	IAPINZA DLPINZA DAPINZA		
TAJO	LROS DAPINZA	ACF LROS ABASROS	LCF ACF ABASROS ILPINZA IAPINZA DLPINZA	LCF ACF LROS ILPINZA DLPINZA DAPINZA	LCF ILPINZA DLPINZA DAPINZA	ACF LROS ILPINZA IAPINZA DLPINZA DAPINZA	LCF LROS ILPINZA	
	NERVIÓN	CATALANA	DUERO	EBRO	GUADALQUIVIR	GUADIANA	JUCAR	TAJO

Tabla 55. ANCOVA de los ejemplares macho de las ocho cuencas hidrológicas analizadas.

NERVIÓN								
CATALANA								
DUERO	ACF LROS ILPINZA DLPINZA	ACF LROS ILPINZA IAPINZA						
EBRO	ACF ABASROS	LCF LROS ABASROS IAPINZA DAPINZA	ACF LROS ILPINZA IAPINZA DAPINZA					
GUADALQUIVIR	LROS ILPINZA DLPINZA	LCF LROS	ACF IAPINZA	LCF LROS ABASROS IAPINZA CLPINZA DAPINZA				
GUADIANA	LROS ILPINZA IAPINZA	IAPINZA	ACF LROS IAPINZA DLPINZA	LROS IAPINZA DAPINZA	LCF LROS			
JUCAR	LROS	LROS	ACF ILPINZA IAPINZA DLPINZA	LROS IAPINZA	LCF LROS DLPINZA	LROS		
TAJO	ILPINZA IAPINZA		ACF	LCF LROS IAPINZA DAPINZA		LCF	LCF	
	NERVIÓN	CATALANA	DUERO	EBRO	GUADALQUIVIR	GUADIANA	JUCAR	TAJO

Tabla 56. ANCOVA de los ejemplares hembra de las ocho cuencas hidrológicas analizadas.

En último lugar se llevó a cabo el análisis de machos y, a continuación, de hembras, agrupados por vertientes (Tablas 57 y 58). En los dos casos todas las variables dependientes (LCF, ACF, LROS, ABASROS, ILPINZA, IAPINZA, DLPINZA, DAPINZA) resultaron diferentes, y en los mismos sentidos, dependiendo de la vertiente.

Atendiendo a las Tablas 57 y 58 observamos que al aumentar el número de individuos en los grupos, en este caso vertientes, el comportamiento en ambos sexos es prácticamente similar.

Todos los valores de las variables morfométricas en la vertiente atlántica (CUE, A. Cuende, GRA, A. Ermitas, LEO, L. Valsemana, MAD, M. Madalena, POZ, A. Pozuelo, PVS, R. Nervión) se encuentran por debajo de la media. Únicamente el valor de la anchura de la pinza izquierda (IAPINZA), también por debajo, aparece en el caso de los machos.

Para el caso de la vertiente mediterránea (GIR (A. Santa Margarida), GUZ (A. Guztar), NAV (R. Ega), VIL (R. Guadazaón)) los valores de las variables significativas están por debajo de la media. En el caso de las hembras el número de estas variables es mayor, incluyendo la longitud del cefalotórax (LCF), del rostro (LROS) y la anchura de la base del rostro (ABASROS).

CANTÁBRICA		
MEDITERRÁNEA	ACF LROS ABASROS ILPINZA IDPINZA DLPINZA DAPINZA	
	CANTÁBRICA	MEDITERRÁNEA

Tabla 57. ANCOVA de los ejemplares macho de las dos vertientes analizadas.

CANTÁBRICA		
MEDITERRÁNEA	LCF ACF LROS ILPINZA IAPINZA DLPINZA DAPINZA	
	CANTÁBRICA	MEDITERRÁNEA

Tabla 58. ANCOVA de los ejemplares hembra de las dos vertientes analizadas.

En general, en los tres análisis (por poblaciones, cuencas y vertientes) llevados a cabo se observa el mismo patrón de variación. Se repite la elevada variabilidad en las variables pinzas (anchura y longitud) y en las medidas del rostro (longitud del rostro y anchura de la base del rostro), en ambos sexos. Y en la Astacifactoría, RIL, todas las variables estadísticamente significativas son superiores a la media.

3.2.6 Análisis de Componentes Principales

En la Tabla 59 vemos los dos primeros factores calculados por el Análisis de Componentes Principales (PCA), 7,52 y 0,65. El primer eje explica el 83,58% de la varianza total y el segundo explica el 9,28%. En conjunto los dos ejes explican el 90,82 de la varianza.

	PC1	PC2
VALOR	7,52	0,65
Porcentaje	83,58	7,24
Porcentaje acumulado	83,58	90,82
VARIABLE		
PESO	0,96	-0,07
LCF	0,96	0,19
LT	0,93	0,27
ACF	0,95	0,11
LROS	0,85	0,33
ABASROS	0,90	0,28
ILPINZA	0,92	-0,29
IAPINZA	0,90	-0,29
DLPINZA	0,92	-0,29
DAPINZA	0,90	-0,30
IESP3MAX	0,44	0,00
DESP3MAX	0,40	-0,01
IESPCER	0,17	0,22
DESPCER	0,20	0,16

Tabla 59. Resultados del PCA a partir de la matriz de correlación de las variables morfométricas, de las once poblaciones de *A. pallipes* españolas.

En la Tabla 60 puede apreciarse el resultado del análisis de correlaciones. Se trata de correlaciones positivas entre todas las variables de longitud y anchura (LCF, LT, LROS, ABASROS, ILPINZA, IAPINZA, DLPINZA y DAPINZA) donde vemos que los valores de correlación más bajos corresponden a la anchura de la base del rostro (ABASROS), mientras que los valores más altos corresponden a las pinzas y a la longitud y anchura del cefalotórax (LCF y ACF).

LCF	1,00									
LT	0,95	1,00								
ACF	0,93	0,91	1,00							
LROS	0,84	0,82	0,81	1,00						
ABASROS	0,90	0,89	0,87	0,80	1,00					
ILPINZA	0,83	0,77	0,84	0,69	0,75	1,00				
IAPINZA	0,79	0,75	0,82	0,67	0,73	0,95	1,00			
DLPINZA	0,83	0,77	0,83	0,69	0,75	0,89	0,83	1,00		
DAPINZA	0,79	0,75	0,81	0,68	0,72	0,85	0,83	0,96	1,00	
	LCF	LT	ACF	LROS	ABASROS	ILPINZA	IAPINZA	DLPINZA	DAPINZA	

Tabla 60. Matriz de correlaciones de las medidas morfométricas (anchuras y longitudes) de los individuos de ambos sexos para las once poblaciones españolas de *A. pallipes* analizadas.

A través de la estrategia de clasificación mixta se obtienen tres clases que pasamos a describir a continuación. La descripción de las clases se hace según los pasos explicados en el apartado de material y métodos. La Tabla 61 muestra la caracterización de las variables morfométricas. En la clase 1, con 162 individuos, ocho variables morfométricas son características de esta clase y además todas tienen un valor test positivo, lo que quiere decir que la media dentro de la clase es superior a la media general. La variable longitud de cefalotórax (LCF) estadísticamente es la más significativa (valor test=5,14), la más característica de la clase 1.

En la clase 2, con 198 individuos, todas las variables morfométricas son características de ella. Al contrario de lo que sucede en la clase 1 todas tienen un valor test negativo, lo que quiere decir que la media dentro de la clase es inferior a la media general. En este caso la longitud y anchura del cefalotórax (LCF, ACF) son las variables estadísticamente más significativas (valor test=16,04 y 15,57, respectivamente), las más características de la clase 2.

De la clase 3, con 75 individuos, hay dos variables que no son características de ella, las espinas cervicales, tanto izquierdas como derechas. Todas las variables morfométricas presentan un valor test positivo, siendo la media dentro de la clase inferior a la media general. La variable peso (PESO) estadísticamente es la más significativa (valor test=17,06) de la clase 3.

Variable	\bar{X} clase	\bar{X} general	σ clase	σ general	Valor test	p
Clase 1: aparecen nueve variables morfométricas. La muestra es de 162 individuos						
LCF	3,88	3,64	0,35	0,74	5,14	***
ABASROS	0,66	0,62	0,05	0,11	5,11	***
LROS	1,16	1,11	0,10	0,20	4,52	***
ACF	2,09	1,96	0,21	0,46	4,42	***
DESP3MAX	6,28	5,85	1,36	1,65	4,11	***
IESPCER	2,58	2,30	1,17	1,09	4,09	***
IESP3MAX	6,30	5,95	1,22	1,53	3,67	***
DESPCER	2,56	2,34	1,15	1,15	2,97	***
Clase 2: aparecen todas la variables morfométricas. La muestra es de 198 individuos						
IESPCER	2,07	2,30	0,95	1,09	-4,00	***
DESPCER	2,08	2,34	0,97	1,15	-4,30	***
DESP3MAX	5,18	5,85	1,67	1,65	-7,52	***
IESP3MAX	5,27	5,95	1,57	1,53	-8,20	***
DLPINZA	1,81	2,55	0,40	1,02	-13,50	***
DAPINZA	0,72	1,03	0,18	0,43	-13,55	***
IAPINZA	0,72	1,04	0,19	0,43	-13,64	***
ILPINZA	1,81	2,56	0,38	1,00	-13,71	***
PESO	7,68	15,70	2,60	10,77	-14,17	***
LROS	0,95	1,11	0,12	0,20	-14,30	***
ABASROS	0,53	0,62	0,06	0,11	-15,27	***
ACF	1,59	1,96	0,22	0,46	-15,57	***
LCF	3,02	3,64	0,35	0,74	-16,04	***
Clase 3: aparecen todas la variables morfométricas. La muestra es de 75 individuos						
PESO	35,19	15,70	8,23	10,77	17,06	***
ILPINZA	4,22	2,56	0,71	1,00	15,75	***
DLPINZA	4,25	2,55	0,75	1,02	15,65	***
DAPINZA	1,73	1,03	0,30	0,43	15,16	***
IAPINZA	1,72	1,04	0,30	0,43	15,04	***
ACF	2,68	1,96	0,25	0,46	14,85	***
LCF	1,78	3,64	0,36	0,74	14,56	***
ABASROS	0,78	0,62	0,06	0,11	13,55	***
LROSTRO	1,38	1,11	0,16	0,20	13,01	***
IESP3MAX	6,94	5,95	1,19	1,53	6,08	***
DESP3MAX	6,67	5,85	1,50	1,65	4,62	***

Tabla 61. Caracterización de las variables morfométricas de las once poblaciones españolas de *A.pallipes* analizadas. (***: $p < 0,001$)

El siguiente paso es formar grupos de individuos homogéneos respecto a las variables morfométricas (Figura 30). Se observan 2 grupos de poblaciones, correspondientes a los morfotipos caracterizados en la Tabla 62. Uno formado por la clase 3 y el otro que engloba a las clases 1 y 2.

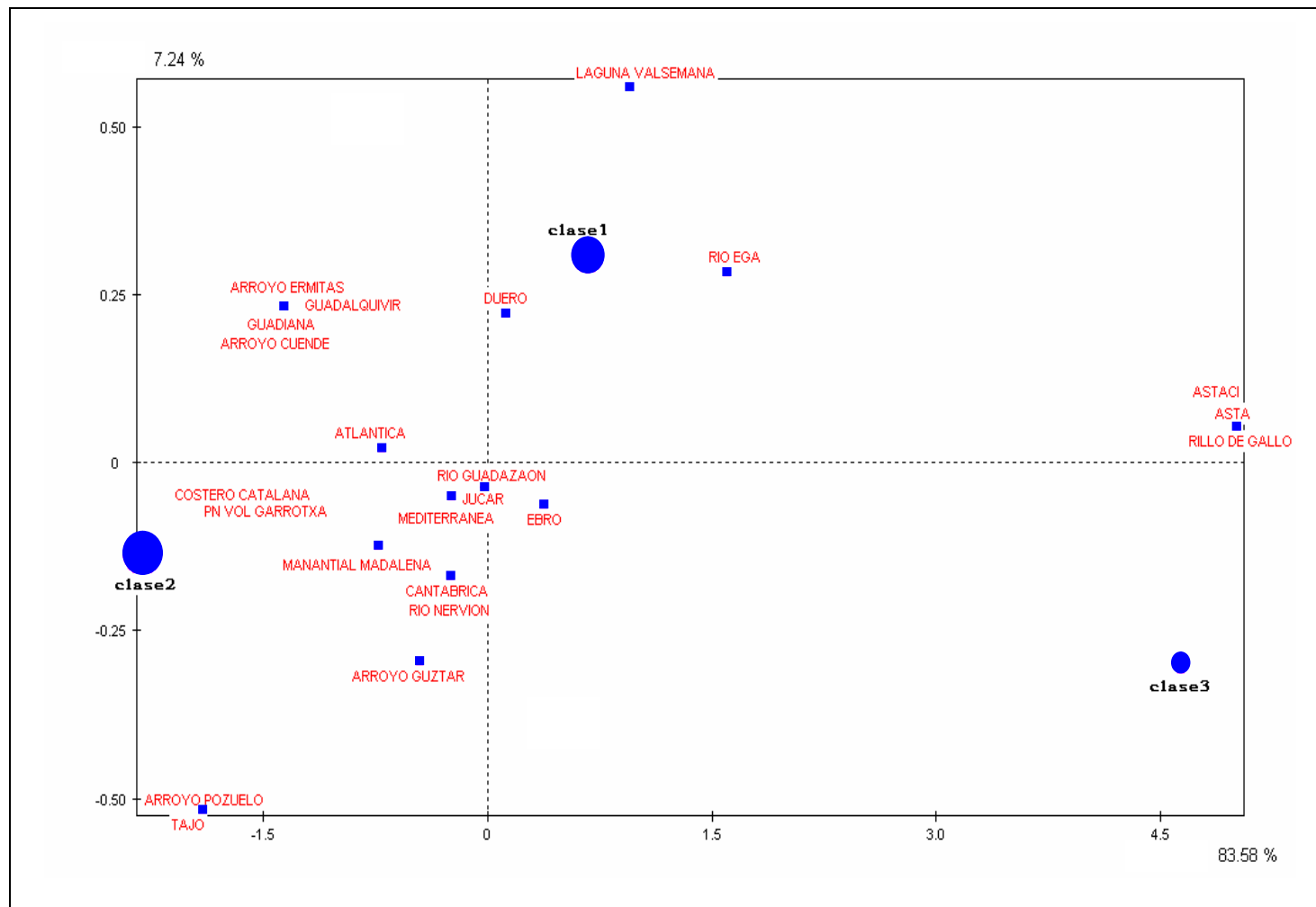


Figura 30. Representación gráfica en dos dimensiones del análisis de componentes principales de todos los individuos de las once poblaciones españolas de *A. pallipes*.

Se observan 3 morfotipos diferentes que se explican a través de la caracterización de las clases de la partición de las modalidades en la Tabla 62. El primer morfotipo, caracterizado por las variables longitud de cefalotórax (LCF), anchura de la base del rostro (ABASROS), longitud del rostro (LROS) y anchura del cefalotórax (ACF), todas ellas con valores por encima de la media, agrupa a las poblaciones de Río Ega (NAV) y de Laguna Valsemana (LEO), pertenecientes a las cuencas de la mitad norte de la Península, Ebro y Duero respectivamente. Dentro del segundo morfotipo se encuentran las poblaciones de Arroyo Pozuelo (POZ) y Arroyo Santa Margarida (GIR), poblaciones que pertenecen a dos cuencas hidrográficas distintas (Tajo y Costero catalana, respectivamente). Próximas a este segundo morfotipo se encuentran las poblaciones de Manantial Madalena (MAD), Arroyo Guztar (GUZ), Río Nervión (PVS) y Río Guadazaón (VIL). El segundo morfotipo se caracteriza por las variables longitud y anchura de cefalotórax (LCF y ACF), con valores por debajo de la media. Y el tercer morfotipo, incluye únicamente a la población de la Astacifactoría de Rillo de Gallo (RIL) y se caracteriza por las variables peso y anchura y longitud de ambas pinzas (PESO, ILPINZA, DLPINZA, DAPINZA, DLPINZA).

Variable	Modalidad	% de la modalidad en la clase	% de la modalidad en total muestra	% de la clase en la modalidad	V test	p	Peso
Clase 1. La muestra es de 162 individuos							
Población	LEO	19,14	9,43	75,61	5,09	***	41
Cuenca	Duero	29,63	18,62	59,26	4,35	***	81
Cuenca	Ebro	22,22	15,40	53,73	2,86	**	67
Población	NAV	10,49	6,21	62,96	2,60	**	27
Vertiente	Mediterránea	40,12	32,64	45,77	2,45	**	142
Clase 2. La muestra es de 198 individuos							
Cuenca	Tajo	17,68	9,43	85,37	5,37	***	41
Población	POZ	17,68	9,43	85,37	5,37	***	41
Vertiente	Atlántica	67,68	57,70	53,39	3,77	***	251
Sexo	Hembra	50,00	42,99	52,94	2,60	***	187
Población	GIR	13,13	9,20	65,00	2,43	***	40
Cuenca	Costero catalana	13,13	9,20	65,00	2,43	***	40
Clase 3. La muestra es de 75 individuos							
Vertiente	Astacifactoría	52,00	9,66	92,86	11,54	***	42
Población	RIL	52,00	9,66	92,86	11,54	***	42
Cuenca	Astacifactoría	52,00	9,66	92,86	11,54	***	42
Sexo	Macho	77,33	57,01	23,39	3,88	***	248

Tabla 62. Morfotipos obtenidos en el análisis de componentes principales de las once poblaciones españolas de *A. pallipes*.

** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$

3.2.6.1 Análisis de componentes principales de las hembras

En la Tabla 63 vemos los dos primeros factores calculados que toman unos valores de 7,61 y 0,46, respectivamente. El primero de ellos explica el 84,58% de la varianza total y el segundo el 5,09% de la misma.

	PC1	PC2
VALOR	7,61	0,46
Porcentaje	84,58	5,09
Porcentaje acumulado	84,58	89,68
VARIABLE		
PESO	0,95	0,03
LCF	0,96	0,15
LT	0,94	0,15
ACF	0,95	0,07
LROS	0,87	0,25
ABASROS	0,92	0,16
ILPINZA	0,93	0,03
IAPINZA	0,91	-0,02
DLPINZA	0,91	-0,36
DAPINZA	0,88	-0,44
IESP3MAX	0,41	0,04
DESP3MAX	0,43	0,04
IESPCER	0,31	0,08
DESPCER	0,30	0,02

Tabla 63. Resultados del PCA a partir de de la matriz de correlación de las variables morfométricas de los ejemplares hembra de las once poblaciones de *A. pallipes* españolas.

Todas las correlaciones entre las variables de longitud y anchura (LCF, LT, LROS, ABASROS, ILPINZA, IAPINZA, DLPINZA y DAPINZA) son positivas. En la matriz de correlaciones (Tabla 64) se observa que los valores de correlación más bajos corresponden a las medidas del rostro, al igual que veíamos al analizar todos los individuos, machos y hembras, juntos. El valor más bajo corresponde a la longitud del rostro, LROS, (0,70). Por el contrario, los valores más altos corresponden a las pinzas y a las longitudes, total y de cefalotórax (LT y LCF) y anchura del cefalotórax (ACF), siendo 0,94, 0,93 y 0,90, respectivamente.

LCF	1,00								
LT	0,93	1,00							
ACF	0,93	0,90	1,00						
LROS	0,85	0,81	0,81	1,00					
ABASROS	0,89	0,89	0,87	0,80	1,00				
ILPINZA	0,87	0,83	0,86	0,76	0,84	1,00			
IAPINZA	0,84	0,82	0,86	0,74	0,80	0,94	1,00		
DLPINZA	0,83	0,80	0,83	0,73	0,80	0,82	0,78	1,00	
DAPINZA	0,78	0,77	0,80	0,70	0,74	0,76	0,78	0,94	1,00
	LCF	LT	ACF	LROS	ABASROS	ILPINZA	IAPINZA	DLPINZA	DAPINZA

Tabla 64. Matriz de correlaciones de las medidas morfométricas (anchuras y longitudes) de las hembras para las once poblaciones españolas de *A. pallipes* analizadas.

A través de la estrategia de clasificación mixta se obtienen tres clases que pasamos a describir a continuación. Como hemos comentado anteriormente, la descripción de las clases se hace según los pasos explicados en el apartado de material y métodos. En la Tabla 65 se muestra la caracterización de las variables morfométricas. Únicamente dos variables son características de la clase 1, con 81 individuos, las espinas del tercer maxilípodo, izquierdo y derecho (DESP3MAX, IESP3MAX). Ambas tienen un valor test positivo, lo que quiere decir que la media dentro de la clase es superior a la media general.

Todas las variables morfométricas son características de la clase 2, formada por 61 individuos. Todas ellas presentan un valor test negativo, así pues, la media dentro de la clase es inferior a la media general. Las variables más características son la longitud del cefalotórax (LCF), anchura de la base del rostro (ABASROS) y anchura del cefalotórax (ACF).

En la clase 3, con 45 individuos, todas las variables son características de ella. Al contrario de lo que sucede en la clase 2, el valor test es positivo. La

variable peso, junto con la anchura y longitud del cefalotórax, son estadísticamente las más significativas de esta clase.

Variable	\bar{X} clase	\bar{X} general	σ clase	σ general	Valor test	p
Clase 1: aparecen dos variables morfométricas. La muestra es de 81 individuos						
DESP3MAX	5,93	5,56	1,63	1,59	2,79	**
IESP3MAX	6,01	5,68	1,46	1,58	2,44	**
Clase 2: aparecen todas las variables morfométricas. La muestra es de 61 individuos						
DESPCER	2,08	2,54	0,96	1,08	-4,07	***
IESPCER	2,00	2,50	0,88	1,09	-4,39	***
IESP3MAX	4,68	5,68	1,47	1,58	-6,00	***
DESP3MAX	4,50	5,56	1,33	1,59	-6,29	***
DLPINZA	1,48	2,08	0,24	0,67	-8,23	***
LROS	0,90	1,09	0,11	0,21	-8,28	***
ILPINZA	1,49	2,10	0,22	0,67	-8,29	***
DAPINZA	0,58	0,86	0,11	0,30	-8,47	***
PESO	5,76	13,11	1,72	8,20	-8,51	***
IAPINZA	0,58	0,87	0,11	0,31	-8,67	***
ACF	1,44	1,88	0,19	0,45	-9,18	***
ABASROS	0,51	0,62	0,05	0,11	-9,35	***
LCF	2,81	3,54	0,33	0,73	-9,52	***
Clase 3: aparecen todas las variables morfométricas. La muestra es de 45 individuos						
PESO	24,98	13,11	6,59	8,20	10,96	***
ACF	2,50	1,88	0,26	0,45	10,46	***
LCF	4,54	3,54	0,42	0,73	10,42	***
DLPINZA	2,97	2,08	0,53	0,67	10,20	***
ILPINZA	3,00	2,10	0,53	0,67	10,11	***
DAPINZA	1,25	0,86	0,22	0,30	9,92	***
IAPINZA	1,29	0,87	0,22	0,31	9,91	***
ABASROS	0,77	0,62	0,07	0,11	9,79	***
LROS	1,35	1,09	0,16	0,21	9,19	***
IESPCER	3,11	2,50	1,33	1,09	4,26	***
DESPCER	3,13	2,54	1,16	1,08	4,13	***
IESP3MAX	6,47	5,68	1,19	1,58	3,78	***
DESP3MAX	6,34	5,56	0,97	1,59	3,70	***

Tabla 65. Caracterización de las variables morfométricas de los ejemplares hembra de las once poblaciones españolas de *A.pallipes* analizadas.

: $p < 0,01$; *: $p < 0,001$

El siguiente paso, de nuevo, es formar grupos de individuos homogéneos respecto a las variables morfométricas, que pueden observarse en la Figura 31. En esta figura pueden observarse 2 grupos (por un lado, las

clases 1 y 2 forman un solo grupo y, por otro, la clase 3) que agrupan a diferentes poblaciones, tal y como se muestra en la Tabla 66.

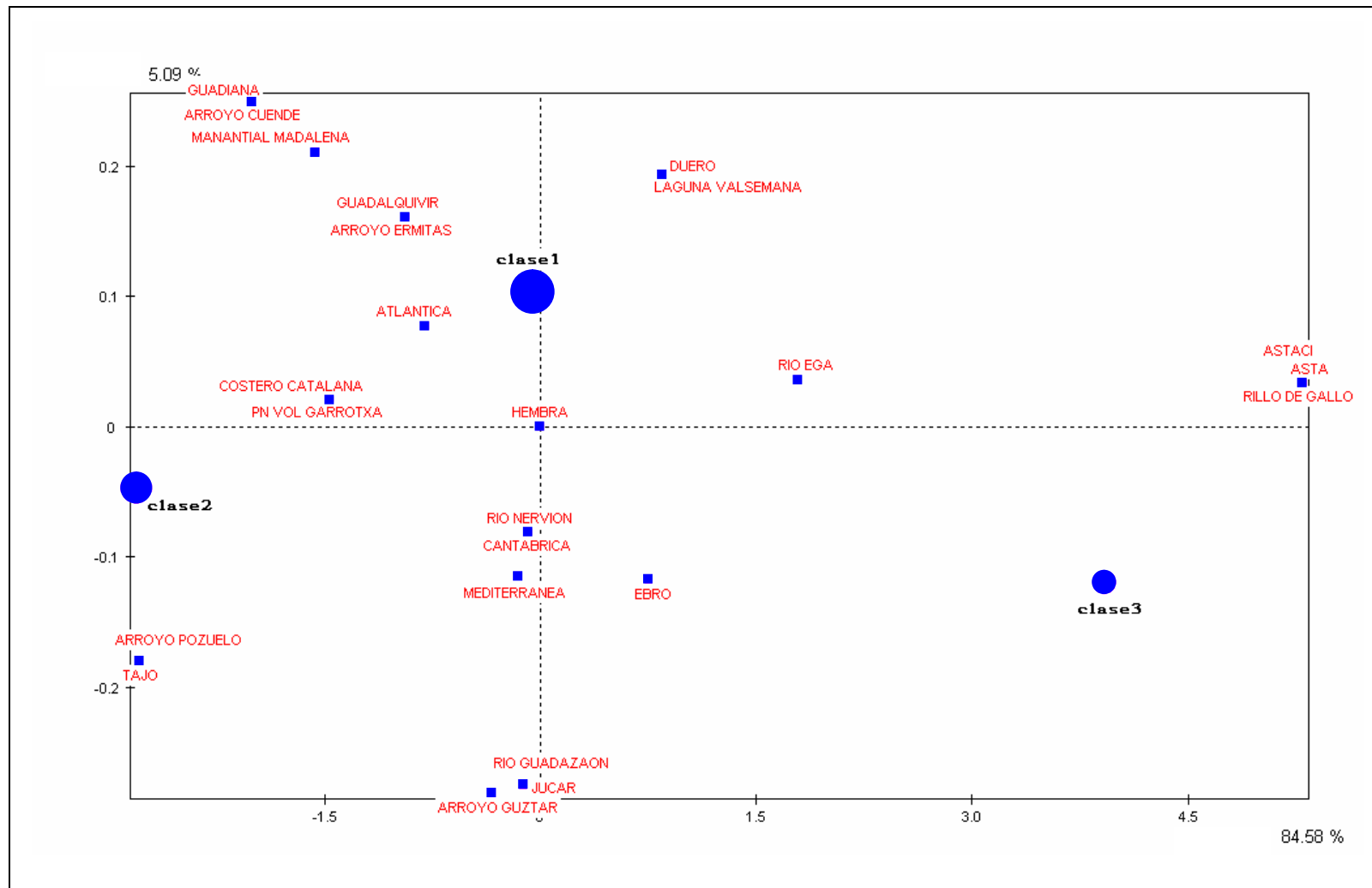


Figura 31. Representación gráfica en dos dimensiones del análisis de componentes principales de los ejemplares hembra de las once poblaciones españolas de *A. pallipes*.

En la Tabla 67 se observan tres morfotipos diferentes. El primero de ellos incluye las poblaciones de Arroyo Guztar (GUZ), Laguna Valsemana (LEO) y Arroyo Ermitas (GRA), pertenecientes a cuencas hidrográficas distintas. Próximas a este grupo encontramos dos poblaciones, R. Nervión (PVS) y R. Guadazaón (VIL). Únicamente la población de L. Valsemana (LEO) se incluía también en la clase 1 en el análisis de componentes principales de machos y hembras conjunto. Se trata del grupo más numeroso, con 81 individuos.

En la segunda clase, con 61 individuos, sólo aparece la población de A. Pozuelo (POZ), del mismo modo que en el análisis de todos los individuos agrupados por sexos. Dos poblaciones se encuentran cercanas, A. Santa Margarida (GIR) y M. Madalena (MAD). Esta clase se caracteriza por las variables longitud y anchura de cefalotórax (LCF y ACF), con valores por debajo de la media.

Y en último lugar, en la tercera y menos numerosa de las clases (45 individuos), se encuentra la población de la Astacifactoría de Rillo (RIL), de igual forma que en el análisis conjunto de machos y hembras, y también caracterizada, fundamentalmente, por el peso con valores por encima de la media. Únicamente hay una población próxima, R. Ega (NAV).

Variable	Modalidad	% de la modalidad en la clase	% de la modalidad en total muestra	% de la clase en la modalidad	V. Test	p	Peso
Clase 1. La muestra es de 81 individuos							
Sexo	Hembra	100,00	100,00	43,32	99,99	***	187
Población	GUZ	17,28	8,02	93,33	3,95	***	15
Población	LEO	19,75	11,23	76,19	3,00	*	21
Cuenca	Duero	19,75	11,76	72,73	2,74	**	22
Población	GRA	20,99	13,37	68,00	2,45	**	25
Cuenca	Guadalquivir	20,99	13,37	68,00	2,45	**	25
Cuenca	Ebro	24,69	16,58	64,52	2,40	**	31
Clase 2. La muestra es de 61 individuos							
Sexo	Hembra	100,00	100,00	32,62	99,99	***	187
Cuenca	Tajo	26,23	8,56	100,00	5,78	***	16
Población	POZ	26,23	8,56	100,00	5,78	***	16
Vertiente	Atlántica	68,85	52,94	42,42	2,90	**	99
Clase 3. La muestra es de 45 individuos							
Sexo	Hembra	100,00	100,00	24,06	99,99	***	187
Población	RIL	37,78	9,09	100,00	6,94	***	17
Cuenca	Astacifactoría	37,78	9,09	100,00	6,94	***	17
Vertiente	Astacifactoría	37,78	9,09	100,00	6,94	***	17
Población	NAV	20,00	8,56	56,25	2,66	**	16

Tabla 66. Morfotipos obtenidos en el análisis de componentes principales de los ejemplares hembra de las once poblaciones españolas de *A. pallipes* analizadas.

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

3.2.6.2 Análisis de componentes principales de los machos

En la Tabla 67 vemos los dos primeros factores calculados por el Análisis de Componentes Principales (PCA) que explican el 87,12% y el 4,48% de la varianza total, respectivamente.

El resultado del análisis de correlación es muy similar al obtenido cuando se analizan, por un lado, conjuntamente los machos y las hembras, y por otro lado, las hembras solas. Como en los casos anteriores, las correlaciones entre todas las variables de longitud y anchura (LCF, LT, LROS, ABASROS, ILPINZA, IAPINZA, DLPINZA y DAPINZA) son positivas. En la matriz de correlaciones (Tabla 68) se puede observar que los

valores de correlación más bajos corresponden a los valores de la longitud del rostro, LROS. Los valores más altos corresponden a las longitudes, total y de cefalotórax (LT y LCF), respectivamente.

	PC1	PC2
VALOR	7,84	0,40
Porcentaje	87,12	4,48
Porcentaje acumulado	87,12	91,59
VARIABLE		
PESO	0,96	0,05
LCF	0,97	-0,14
LT	0,96	-0,13
ACF	0,96	-0,05
LROS	0,86	-0,34
ABASROS	0,92	-0,17
ILPINZA	0,94	0,25
IAPINZA	0,89	0,36
DLPINZA	0,96	0,08
DAPINZA	0,92	0,14
IESP3MAX	0,43	0,03
DESP3MAX	0,35	0,08
IESPCER	0,14	-0,09
DESPCER	0,20	0,01

Tabla 67. Resultados del PCA a partir de la matriz de correlación de las variables morfométricas de los ejemplares macho de las once poblaciones de *A. pallipes* españolas.

LCF	1,00									
LT	0,97	1,00								
ACF	0,94	0,94	1,00							
LROS	0,83	0,83	0,81	1,00						
ABASROS	0,91	0,90	0,89	0,79	1,00					
ILPINZA	0,88	0,88	0,89	0,75	0,83	1,00				
IAPINZA	0,80	0,81	0,83	0,70	0,77	0,95	1,00			
DLPINZA	0,91	0,90	0,91	0,77	0,85	0,90	0,83	1,00		
DAPINZA	0,85	0,85	0,86	0,75	0,80	0,86	0,83	0,95	1,00	
	LCF	LT	ACF	LROS	ABASROS	ILPINZA	IAPINZA	DLPINZA	DAPINZA	

Tabla 68. Matriz de correlaciones de las medidas morfométricas (anchuras y longitudes) de los machos para las once poblaciones españolas de *A. pallipes* analizadas.

A través de la estrategia de clasificación mixta se obtienen tres clases que pasamos a describir a continuación. En la Tabla 69 se muestra la caracterización de las variables morfométricas. En la clase 1, con 118 individuos, todas las variables son características de esta clase, excepto las espinas cervicales izquierdas (IESPCER). Éstas tienen un valor test negativo, lo que quiere decir que la media dentro de la clase es inferior a la media general.

En la clase 2, con 78 individuos, sólo tres variables morfométricas son características de ellas. Todas las variables tienen un valor test positivo y en este caso, la longitud del cefalotórax (LCF) es la variable estadísticamente más significativa (valor test=2,73), la más “característica” de la clase 2, igual que en el análisis de todos los individuos juntos y en el de las hembras.

De la clase 3, con 52 individuos, todas las variables morfométricas son características excepto las espinas cervicales izquierdas (IESPCER). El valor test es positivo en todos los casos, lo que quiere decir que la media dentro de la clase es superior a la media general. La variable peso estadísticamente es la más significativa (valor test=13,45) de la clase 3.

En la Figura 32 se pueden observar los grupos de individuos homogéneos respecto a las variables morfométricas. En esta figura se pueden observar las poblaciones agrupadas en 2 clases, como en los dos análisis de componentes anteriores, para todos los individuos y para las hembras, pero en este caso la población de la Astacifactoría, RIL, forma parte de las clases 2 y 3.

Variable	Modalidad	% de la modalidad en la clase	% de la modalidad en total muestra	% de la clase en la modalidad	V. Test	p
Clase 1: aparecen trece variables morfométricas. La muestra es de 118 individuos						
DESPCER	1,99	2,19	0,92	1,18	-2,59	**
DESP3MAX	5,57	6,09	1,63	1,66	-4,37	***
IESP3MAX	5,57	6,15	1,42	1,46	-5,66	***
LROS	0,98	1,12	0,10	0,19	-10,79	***
IAPINZA	0,82	1,17	0,20	0,46	-10,93	***
PESO	8,74	17,64	2,82	12,00	-11,11	***
ILPINZA	2,07	2,91	0,41	1,06	-11,28	***
ABASROS	0,54	0,62	0,06	0,10	-11,66	***
DAPINZA	0,80	1,16	0,19	0,46	-11,71	***
DLPINZA	3,02	2,89	0,42	1,09	-11,72	***
ACF	1,67	2,03	0,21	0,45	-11,89	***
LCF	3,12	3,72	0,35	0,73	-12,15	***
Clase 2: muestra cuatro variables morfométricas. La muestra es de 78 individuos						
LCF	3,91	3,72	0,34	0,73	2,73	**
ABASROS	0,65	0,62	0,04	0,10	2,50	**
LROS	1,16	1,12	0,10	0,19	2,34	**
Clase 3: aparecen trece variables morfométricas. La muestra es de 52 individuos						
PESO	37,58	17,64	7,85	12,00	13,45	***
DLPINZA	4,58	2,89	0,56	1,09	12,41	***
ILPINZA	4,54	2,91	0,57	1,06	12,30	***
ACF	2,70	2,03	0,25	0,45	11,95	***
LCF	4,79	3,72	0,31	0,73	11,78	***
DAPINZA	1,84	1,16	0,24	0,46	11,78	***
IAPINZA	1,83	1,17	0,28	0,46	11,65	***
ABASROS	0,77	0,62	0,05	0,10	11,44	***
LROS	1,36	1,12	0,15	0,19	10,51	***
IESP3MAX	7,05	6,15	1,16	1,46	4,95	***
DESP3MAX	6,84	6,09	1,53	1,66	3,64	***

Tabla 69. Caracterización de las variables morfométricas de los ejemplares macho de las once poblaciones españolas de *A.pallipes* analizadas.

.: $p < 0,01$; *: $p < 0,001$

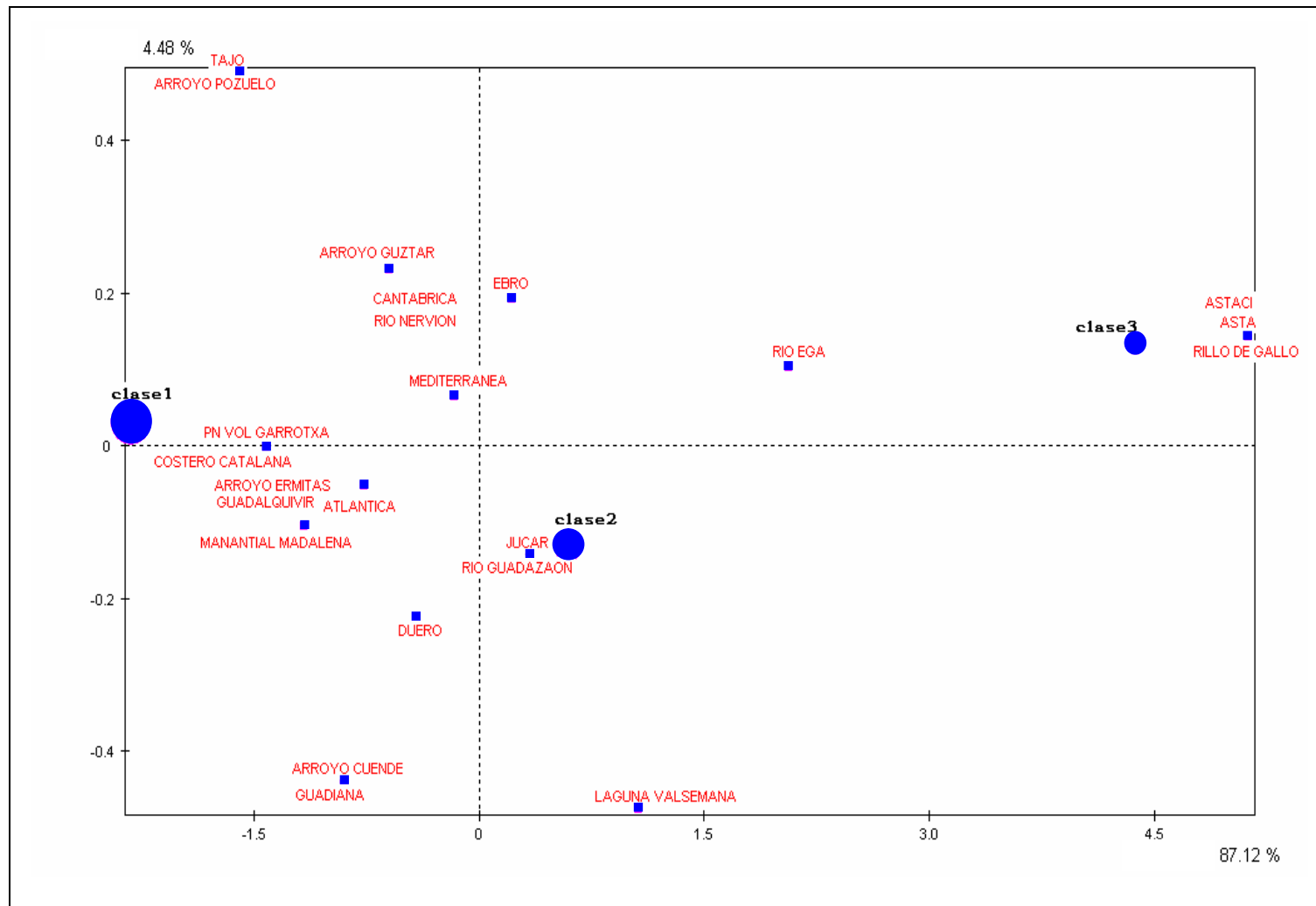


Figura 32. Representación gráfica en dos dimensiones del análisis de componentes principales de los machos de las once poblaciones españolas de *A. pallipes*.

Al analizar los machos de las once poblaciones de *A. pallipes* se observan 3 morfotipos (Tabla 70). El primero de ellos corresponde a los machos que, al igual que en los análisis anteriores, incluye a los individuos de la población del A. Pozuelo (POZ). Además, se incluye la población del M. Madalena (MAD). Ambas poblaciones pertenecen a la misma vertiente aunque a diferente cuenca, Tajo y Duero, respectivamente. Se trata de la clase más abundante.

A diferencia de los dos análisis anteriores (por un lado de los dos sexos conjuntamente y, por otro, de las hembras), los dos últimos morfotipos se agrupan en uno solo, caracterizado por el peso y que incluye, en ambos casos, a la población de la Astacifactoría de Rillo de Gallo (RIL).

Variable	Modalidad	% de la modalidad en la clase	% de la modalidad en total muestra	% de la clase en la modalidad	V. Test	p	Peso
Clase 1. La muestra es de 118 individuos							
Vertiente	Atlántica	74,58	61,29	57,89	3,99	***	152
Cuenca	Tajo	16,95	10,08	80,00	3,27	***	25
Población	POZ	16,95	10,08	80,00	3,27	***	25
Población	MAD	22,03	15,73	66,67	2,43	**	39
Población	LEO	3,39	8,06	20,00	-2,40	**	20
Cuenca	Astacifactoría	0,00	10,08	0,00	-5,43	***	25
Vertiente	Astacifactoría	0,00	10,08	0,00	-5,43	***	25
Población	RIL	0,00	10,08	0,00	-5,43	***	25
Clase 2. La muestra es de 78 individuos							
Cuenca	Astacifactoría	54,35	10,08	0,000	-3,92	***	25
Vertiente	Astacifactoría	54,35	10,08	0,000	-3,92	***	25
Población	RIL	54,35	10,08	0,000	-3,92	***	25
Clase 3. La muestra es de 52 individuos							
Población	RIL	48,08	10,08	100,00	9,13	***	25
Cuenca	Astacifactoría	48,08	10,08	100,00	9,13	***	25
Vertiente	Astacifactoría	48,08	10,08	100,00	9,13	***	25
Población	NAV	13,46	4,44	63,64	2,87	**	11
Cuenca	Duero	9,62	23,79	8,47	-2,67	**	59
Población	MAD	0,00	15,73	0,00	-3,93	***	39
Vertiente	Atlántica	30,77	61,29	10,53	-4,88	***	152

Tabla 70. Morfotipos obtenidos en el análisis de componentes principales de los ejemplares macho de las once poblaciones españolas de *A. pallipes* analizadas.

: $p < 0,01$; *: $p < 0,001$

Tras llevar a cabo el análisis de componentes principales de las poblaciones de *A. pallipes* en tres partes, en primer lugar analizando los individuos en su conjunto (machos y hembras), en segundo lugar las hembras de cangrejo de río y, por último, los machos, hemos encontrado tres morfotipos diferentes que se repiten en cada uno de los tres análisis, dos de los cuales pueden agruparse en uno solo que englobaría a la mayoría de las poblaciones españolas analizadas.

El primer morfotipo se caracteriza por el peso de los individuos y está representado por la población de la Astacifactoría de Rillo de Gallo (RIL). Se incluye en este grupo, aunque no de una forma tan clara como la Astacifactoría, RIL, a la población de R. Ega (NAV).

El segundo morfotipo, caracterizado por las variables longitud y anchura del cefalotórax (LCF y ACF) y anchura de la base del rostro (ABASROS), está representado por la población de POZ (A. Pozuelo). Es el morfotipo más abundante de los descritos y en él se agrupan las restantes poblaciones españolas de cangrejo de río (LEO, CUE, GIR, GRA, GUZ, MAD, PVS y VIL).

Discusión

4 DISCUSIÓN

La combinación simultánea de los marcadores moleculares y morfométricos utilizados en el presente trabajo, ha permitido aprovechar las ventajas que ambos ofrecen para intentar conocer a fondo la estructura poblacional de la especie *Austropotamobius pallipes* en España. Se trata del primer trabajo que recoge información de ocho cuencas hidrográficas diferentes y en el que se utilizan dos metodologías distintas para estudiar la estructura poblacional del cangrejo de río autóctono en nuestro país. Este hecho ofrece, por un lado, la ventaja de un trabajo novedoso pero, por otro, la desventaja de la ausencia de otros datos sobre los que apoyarse.

Aunque hoy en día se disponga de una amplia variedad de métodos moleculares para estudiar los niveles de variabilidad genética, sólo unos pocos se han utilizado en distintas especies de cangrejos de agua dulce, como ya se ha comentado en el apartado de Introducción.

El cangrejo autóctono, *A. pallipes*, es una especie importante en nuestro país desde el punto de vista de la conservación biológica puesto que está catalogado en la Lista Roja de la U.I.C.N. y en el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas en la categoría de "vulnerable". Está sometido a diversos factores de amenaza como el escaso número de poblaciones, rangos geográficos estrechos y la pérdida de su hábitat por acción humana. Por ello, los datos genéticos y morfométricos pueden resultar muy útiles, aportando información sobre la estructura poblacional, identificando posibles unidades de conservación y definiendo los hábitats críticos que albergan la mayor parte de la diversidad genética de la especie.

4.1 IDENTIFICACIÓN

Una de las más importantes aplicaciones de los marcadores RAPD ha sido en el mundo taxonómico. La identificación de bandas monomórficas en géneros, especies e incluso poblaciones de los más diversos organismos [(en el cangrejo de río *Cherax quadricarinatus* (Macaranas *et al.*, 1995), en el género *Barbus* (Callejas, 2001), en la mosca de la fruta *Ceratitis capitata* (Fernández *et al.*, 2001), por citar algunos casos] ha dotado a los taxónomos de claves objetivas y cualitativas presentes en cualquiera de los estadios del desarrollo en que se analice el material y en cualquiera de los tejidos del organismo.

En este trabajo se han analizado 285 individuos pertenecientes a 12 poblaciones diferentes, once de ellas españolas y una italiana, por medio de la técnica RAPD-PCR. Para el estudio de las poblaciones españolas (275 individuos) se han utilizado 10 cebadores (Tabla 6), obteniéndose un total de 133 bandas, de las que 40 (30%) estaban presentes en todos los individuos analizados (Tabla 20) y el resto (70%) eran variables.

Para el estudio de las doce poblaciones en su conjunto (285 individuos) se han empleado 3 de los 10 cebadores mencionados anteriormente, resultando comunes a todos los individuos 3 bandas (Tabla 21). Estas bandas podrían considerarse como marcadores capaces de identificar la especie *Austropotamobius pallipes*, aunque para confirmarlo sería necesario comprobar que no estén presentes en especies relacionadas y así poderlas considerar de forma definitiva como marcadores especie-específicos.

A pesar de que hoy en día no está permitido el consumo de cangrejo autóctono dada su catalogación como especie “vulnerable” en todo el ámbito nacional, estas 3 bandas con las que se podría identificar a la especie *A. pallipes*, en un futuro y con vistas a su comercialización, podrían utilizarse como control del origen genético de los cangrejos, que sería un aspecto muy

importante de la normativa de calidad de la especie. No podemos olvidar el alto valor gastronómico de los cangrejos autóctonos en nuestro país y la importante cotización que tendrían en el mercado frente a otras especies de cangrejos comerciales alóctonas.

La existencia de 7 bandas comunes a todos los individuos analizados en las once poblaciones españolas y ausentes en la muestra italiana, lleva a considerarlas, *a priori*, marcadores “regionales” de la especie *A. pallipes*.

De los cebadores utilizados, OPC04, OPC07 y OPC15 han resultado los más útiles desde el punto de vista de la identificación, ya que con ellos se ponen de manifiesto 16 del total de las 40 bandas específicas de las poblaciones españolas.

Asimismo al utilizar la técnica RAPD, se ha detectado la presencia de bandas exclusivas de población, bandas que están presentes únicamente en una determinada población, aunque no en el 100% de sus individuos. Este es el caso de las poblaciones de NAV (R. Ega) en la que se han detectado 5 bandas exclusivas, 4 bandas en la población de GUZ (A. Guztar), 3 en la de LEO (L. Valsemana), 2 en PVS (R. Nervión) y 1 banda en MAD (M. Madalena) y GRA (A. Ermitas), respectivamente. Este tipo de bandas resultarían válidas para la identificación poblacional, por exclusión, aun cuando su baja frecuencia no permitiría la asignación poblacional en el 100% de los casos.

4.2 CANTIDAD DE VARIABILIDAD GENÉTICA

El análisis de la cantidad de variabilidad genética en las poblaciones de cangrejo autóctono constituye la información básica relacionada con la estructura poblacional de esta especie, y es de primordial importancia en relación con la posible recuperación de sus poblaciones.

El índice de polimorfismo (P), según el criterio del 95%, para las poblaciones españolas de *A. pallipes* analizadas en este trabajo fue de 0,15 (Tabla 23), dentro del rango de los Crustáceos. La cantidad de variabilidad genética estimada para los Crustáceos mediante este índice se encuentra dentro de los niveles medios ($P=0,32$), si tenemos en cuenta que se incluyen dentro de los invertebrados, caracterizados, en general, por niveles muy altos de polimorfismo (Nevo *et al.*, 1984).

De esta forma encontramos que los niveles de polimorfismo observados en otros Crustáceos Decápodos, mediante electroforesis de isoenzimas, son algo más elevados que para el caso de los cangrejos de río. Así, la familia Penaeidae, a la que pertenecen las gambas (*Penaeus* sp.) y los langostinos (*Cambarus* sp.), es la más estudiada desde el punto de vista genético, estimándose una tasa de polimorfismo de $P_{95}=0,22$ (Hedgecock *et al.*, 1976). Y la familia Nephropidae, a la que pertenece la langosta americana (*Homarus americanus*) presenta una tasa de polimorfismo de $P_{95}=0,19$ (Tracey *et al.*, 1975).

El nivel de polimorfismo observado en el caso de los cangrejos de río, mediante análisis isoenzimáticos es de 0,12 (Crandall, 1997). Así, para el género *Astacus*, la tasa de polimorfismo se encuentra entre 10 y 25% (Attard y Pasteur, 1984); para el género *Cambarus*, los valores oscilan entre el 10 y el 20% (Nemeth y Tracey, 1975); en el género *Orconectes*, entre 11 y 18% (Nemeth y Tracey, 1975) y 5% (Attard y Pasteur, 1984) y en *Procambarus*, un 5% (Attard y Pasteur, 1984) y entre 1 y 12% (Buscack, 1988).

Los datos del presente estudio muestran que el 15% de los loci son polimórficos según el criterio del 95% y nos indican que los niveles de polimorfismo en la especie *A. pallipes* se encuentran dentro del rango establecido para otras especies de cangrejos de río, siendo incluso algo superiores.

En el caso concreto del cangrejo de río los trabajos genético poblacionales no son muy numerosos, especialmente en lo que se refiere a marcadores moleculares y más en concreto a RAPD. La mayor parte de dichos trabajos se han realizado con isoenzimas y todos ellos parecen evidenciar, en general, niveles medios, más bien bajos, de variabilidad genética, como veremos a continuación.

Sí disponemos de información procedente de isoenzimas para la especie *A. pallipes* que, aun no siendo directamente extrapolables con datos obtenidos a partir de RAPD, puesto que generalmente el nivel de variabilidad detectado por las isoenzimas es menor que el detectado por RAPD, nos pueden resultar de interés.

Contamos con la información procedente de un estudio llevado a cabo por Attard y Pasteur (1984) sobre variabilidad y diferenciación genética de cinco especies de cangrejos astácidos mediante electroforesis de proteínas, en el que el polimorfismo estimado para el cangrejo de río fue de 0,10. En poblaciones europeas de *Austropotamobius pallipes* y utilizando la técnica de electroforesis de isoenzimas, Attard y Vianet (1985) observaron un polimorfismo comprendido entre 0,00 y 0,05. Lörtscher y cols. (1997) estudiaron diversas poblaciones de Suiza, Francia e Italia, estimando una tasa de polimorfismo de 0,15. También Lörtscher y cols. (1998) calcularon una tasa de polimorfismo en poblaciones de Suiza y Francia de entre 0,00 y 0,10. Santucci y cols. (1997) analizaron la variabilidad genética en poblaciones europeas del género *Austropotamobius* (*A. pallipes*, *A. italicus* y *A. torrentium*), el polimorfismo según el criterio del 95% fue de 0,004, 0,056 y 0,050

respectivamente; las poblaciones analizadas pertenecientes a la especie *Austropotamobius italicus* mostraron los valores más elevados de polimorfismo. Este último estudio incluye dos poblaciones españolas procedentes de las cuencas del Ebro y Guadalquivir, adscritas a la especie *Austropotamobius italicus*. Ambas poblaciones, destaca Santucci, se encuentran entre las que presentan los valores más altos de heterocigosis (0,03-0,05) y, además, están genéticamente relacionadas con poblaciones procedentes del centro-norte de los Apeninos (Italia).

Existe otro trabajo en el que se han analizado ejemplares del cangrejo de río mediante electroforesis de isoenzimas en 7 poblaciones españolas procedentes de distintas regiones: Aragón, La Rioja y Astacifactoría de Rillo de Gallo (Guadalajara). El valor medio de polimorfismo (P_{95}) fue de 0,13 (Zarazaga, 1993), oscilando los valores en las 7 poblaciones entre 0,05 y 0,27. La tasa de polimorfismo (P_{95}) estimada en la Astacifactoría de Rillo de Gallo fue de 0,12, algo más baja que en nuestro trabajo, en el que, como se comenta más adelante, mediante la técnica RAPD hemos obtenido un valor de polimorfismo de 0,17.

En la bibliografía únicamente se dispone de un trabajo en el que se estima la variación genética de *A. pallipes* por medio de RAPD, en poblaciones del sur de Europa (de Francia, Alemania, Inglaterra e Irlanda) pero en el que no se incluye España. La variabilidad genética intrapoblacional estimada mediante el índice de Shannon varía entre 0,000 y 0,446 (Gouin *et al.*, 2001), siendo el valor medio de 0,159. En nuestro caso el promedio de variabilidad genética intrapoblacional es inferior, 0,024 (Tabla 40).

En otra especie de cangrejo de río *Cherax quadricarinatus*, el nivel de polimorfismo utilizando la técnica RAPD-PCR oscila entre 0,07 y 0,22, con un valor promedio de 0,13 (Macaranas *et al.*, 1995).

Con respecto a la utilización de otro tipo de marcadores Grandjean y cols. (2001) por medio de RFLP de ADN mitocondrial (utilizando 6 endonucleasas de restricción) en 154 individuos de 14 poblaciones españolas, 12 de las cuales pertenecen a la misma provincia (Navarra) y cuenca hidrográfica (Ebro), encontraron un único haplotipo. Este único haplotipo también se encontró en algunos ejemplares de una población del norte de Italia. En este trabajo no se detectó variabilidad genética en las poblaciones estudiadas de cangrejo de río.

En general, en todos estos trabajos (excepto en el RFLP de Grandjean y cols. 2001) se observa que la especie *A. pallipes* presenta niveles medios de variabilidad genética y que a través de análisis enzimáticos se detecta, como era esperable, menor cantidad de variabilidad que con RAPD.

Algunos autores han atribuido los relativos bajos niveles de variabilidad genética encontrados con diferentes marcadores, aloenzimas y ADNmt, a causas como las fragmentaciones, extinciones masivas, reducción de los hábitats disponibles, contaminación, sobrepesca, expansión de parásitos y enfermedades infecciosas e introducción de especies alóctonas muy competitivas (Santucci *et al.*, 1997; Grandjean *et al.*, 1997b).

Nuestros datos acerca de las poblaciones españolas de cangrejo de río evidencian lo que parece ser un nivel o grado de variabilidad genética que podría incluirse dentro de los considerados normales para la especie aunque ligeramente superior. Como ya se comentó anteriormente el valor medio para la especie *A. pallipes* en nuestro país es de 0,15. Así, la cantidad de polimorfismo detectado (Tabla 23) oscila entre 0,07-0,08 para las poblaciones de CUE (A. Cuende) y GRA (A. Ermitas) y entre 0,22-0,24 en las poblaciones de LEO (L. Valsemana) y NAV (R. Ega). Zarazaga (1993), en su estudio enzimático de diversas poblaciones de *A. pallipes* en España, todas geográficamente muy cercanas, estimó la tasa de polimorfismo más elevada

registrada en poblaciones españolas, 0,27. Se trata de una población situada en Zaragoza formada por individuos de distinto origen.

De todas las muestras analizadas, en la población granadina de Arroyo Ermitas (GRA) encontramos la menor cantidad de variabilidad genética ($P=0,08$) (Tabla 23). El cangrejo de río en Andalucía, y concretamente en la provincia de Granada, donde se encuentran las poblaciones más meridionales del continente europeo, ha seguido una evolución muy desfavorable en las últimas décadas (Gil y Alba-Tercedor, 1998, 2000; Galindo *et al.*, 2003). Las poblaciones se han visto afectadas de forma negativa por diversas causas, en la mayoría de los casos desconocidas por no haberse llevado a cabo un seguimiento de las poblaciones con un adecuado plan de gestión. Entre las causas que sí se han llegado a conocer se encuentran las mortalidades masivas, consecuencia directa de la expansión del cangrejo rojo (*Procambarus clarkii*) y su papel como agente portador de la afanomicosis (*Aphanomyces astaci*). En segundo lugar, por acusados períodos de sequía y, por último, por alteraciones antrópicas y sus efectos sobre los cauces y la calidad de las aguas (Gil, 1999). De todas las causas mencionadas que han contribuido a la regresión de las poblaciones del cangrejo de río en Granada, dos son las que han afectado a la población que nos ocupa. En el Arroyo Ermitas, con una población sumamente densa y sana en apariencia, durante los años 1991, 1996, 1997 y 1998, se detectó saprolegniosis, patología causada por un hongo (*Saprolegnia parasitica*) probablemente crónica, que causó una mortalidad masiva tras un período de estrés ambiental. Así pues, dada la escasa variabilidad genética que muestra la población granadina de A. Ermitas (GRA) se podría argumentar que dicha población ha atravesado un reciente e importante cuello de botella.

Por otro lado, los valores más elevados de variabilidad los encontramos en las poblaciones del R. Ega, en la provincia de Navarra

(NAV) ($P=0,28$) y L. Valsemana, en la provincia de León (LEO) ($P=0,22$) (Tabla 23). Ya se ha comentado en la Introducción de este trabajo, en el apartado referido a Legislación, que la especie *Austropotamobius pallipes* goza del máximo nivel de protección en la Comunidad Foral de Navarra por estar clasificada como especie en peligro de extinción (BON núm. 38, de 27 de marzo de 1996). Por otro lado, la población de Valsemana se encuentra en una laguna protegida y de acceso restringido. En ambos casos, Río Ega (NAV) y Laguna de Valsemana (LEO) se han mantenido las poblaciones con un alto número efectivo y eludido enfermedades presentes en otras regiones. Todo ello permite un contenido de variabilidad genética más elevado que en otras zonas.

Según nuestros resultados es en la población de R. Ega (NAV) donde se ha encontrado la mayor cantidad de variabilidad genética, si bien es cierto que la Astacifactoría (RIL) presenta unos niveles de variabilidad genética por encima de la media de las poblaciones españolas de este trabajo. La Astacifactoría de Rillo de Gallo comenzó a funcionar a principios de la década de los 80, con cangrejos procedentes de las cuencas del Ebro y del Tajo, aun cuando en los últimos 15 años no ha tenido aportaciones de cangrejos externas. Esta población se ha mantenido con un elevado número de individuos y lógicamente protegida frente a posibles depredadores y enfermedades, de ahí su polimorfismo de 0,17, algo superior al promedio de las poblaciones españolas (Tabla 23).

Por último, la muestra italiana de la Región de Calabria (COS) presenta unos niveles de variabilidad genética por encima de la media de los obtenidos para las poblaciones españolas, si bien es cierto que en este caso sólo se dispone de datos de tres cebadores y que el tamaño muestral es pequeño y, por tanto, los datos deben ser tomados con prudencia. La información referente a las poblaciones italianas evidencia, en general, valores de variabilidad genética más elevados que los nuestros (Grandjean *et*

al., 2001). En 1859 Italia fue el primer país de Europa afectado por la plaga del cangrejo, que quedó confinada a la región noreste del país y desde entonces no se tiene constancia de la enfermedad (Holdich, 2002b). Por esta razón en Italia las poblaciones de *A. pallipes* no han sufrido la regresión tan acusada que las españolas, que en muy poco tiempo pasaron de ser muy abundantes a estar amenazadas de extinción.

En definitiva, el nivel de variabilidad genética detectado en nuestras poblaciones se incluye dentro de los rangos observados para los cangrejos de agua dulce en general y de *A. pallipes* en particular, en su distribución superior.

Las poblaciones españolas de *A. pallipes* utilizadas para llevar a cabo este estudio, hasta donde nosotros hemos podido saber, son poblaciones, en general, que no han sido objeto de repoblaciones ni expuestas a episodios de contaminación y sobrepesca recientes, lo que favorecería un cierto nivel numérico (aun cuando sabemos que los tamaños efectivos de sus poblaciones no son muy elevados) y, por tanto, de variabilidad genética.

Estos resultados muestran, además, la utilidad de la técnica de RAPD para detectar variación en poblaciones con hipotéticos bajos niveles de variabilidad, en las que los estudios genéticos mediante isoenzimas y ADN mitocondrial no presentan suficiente “sensibilidad”.

Así pues, y con respecto a la cantidad de variabilidad genética observada, los resultados creemos pueden ser de gran interés ya que se trata de los primeros datos genéticos en la especie *Austropotamobius pallipes* en España, en un amplio y, por tanto, significativo muestreo. Se trata de datos necesarios en programas de recuperación si deseamos resultados eficaces para la conservación del cangrejo autóctono.

4.3 PATRONES DE DISTRIBUCIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

Un aspecto de primordial importancia en el estudio de organismos como el que nos ocupa, el cangrejo de río *A. pallipes*, catalogado como especie “vulnerable”, es el que se refiere a los patrones poblacionales de distribución de su variabilidad genética. Esta información puede ser clave en la gestión de la posible recuperación de la especie.

Según nuestros resultados, las poblaciones analizadas parecen mostrar cierto grado de diferenciación. Los valores de similitud interpoblacional son ligeramente inferiores a los valores intrapoblacionales (Tabla 42), y el índice de diversidad de Shannon (Tabla 40) indica que la variabilidad interpoblacional contribuye de manera más importante que la intrapoblacional a la variabilidad total de la especie.

Además, un análisis detallado centrado en cada marcador como el que nos ofrece el análisis χ^2 (Tablas 24 a 34) muestra que las frecuencias de 96 de las 133 bandas de ADN (71%) presentan diferencias significativas entre poblaciones. El test de diferencias estandarizadas indica que en la mayoría de los casos estas diferencias se deben a que la banda presenta en una población una frecuencia significativamente distinta de la frecuencia media (40 bandas) o en dos poblaciones (12 bandas).

El análisis de la varianza molecular (AMOVA) atribuye a las diferencias entre poblaciones una contribución mayor a la variabilidad total (68%) que a las diferencias entre individuos de la misma población (32%) (Tabla 45). El análisis de la varianza molecular (AMOVA) arroja los mismos resultados cuando se analizan las poblaciones españolas de *A. pallipes* agrupadas por cuencas hidrográficas y por vertientes.

El valor estimado del estadístico F_{ST} (índice de subdivisión de la población) para el conjunto de las poblaciones españolas del cangrejo

autóctono mediante los métodos de Wright, Weir y Cockerman y Lynch y Milligan, respectivamente, es 0,60, 0,75 y 0,72 (Tabla 44), lo que indica una clara diferenciación entre poblaciones. Los valores de Nm (tasa efectiva de migración) obtenidos a partir del índice de subdivisión de la población por los métodos mencionados anteriormente oscilan entre 0,1 y 0,2. Se trata de valores mínimos que significarían flujo génico despreciable entre las poblaciones analizadas. Según Wright (1931) y Mayurama (1970, 1972) una tasa efectiva de migración (Nm) cercana al 1 es suficiente para impedir la diferenciación genética de las poblaciones.

El análisis de las distancias genéticas de Nei, lógicamente indica también que existe diferenciación entre las poblaciones, y atribuye los valores de distancias más elevados a la población del noreste peninsular, GIR (A. Santa Margarida) con el resto ($\bar{X}=0,23$).

En definitiva, nuestras poblaciones evidencian una clara diferenciación, la diversidad interpoblacional es claramente superior a la intrapoblacional, el análisis de la varianza molecular (AMOVA) muestra que las diferencias interpoblacionales son superiores a las intrapoblacionales, el índice de subdivisión de la población y las distancias genéticas indican diferenciación entre poblaciones.

Otros autores, Grandjean y cols. (2001), han observado tras analizar mediante RFLP de ADNmt con 6 endonucleasas de restricción la variación en 14 poblaciones españolas de *A. pallipes*, encontrando un único haplotipo. Se trata de un estudio en el que se analizaron 14 poblaciones pertenecientes a cuatro cuencas hidrográficas (Ebro, Duero, cuenca del norte y Guadalquivir), siendo 12 de las 14 poblaciones de la cuenca del Ebro, y de la misma provincia, Navarra. Por el contrario, en nuestro trabajo hemos analizado once poblaciones pertenecientes a ocho cuencas diferentes (Ebro, Duero, Gadiana, Guadalquivir, Tajo, Nervión, Júcar, Costero-catalana), mediante RAPD. Mediante análisis enzimáticos Zarazaga (1993) en poblaciones

españolas del cangrejo de río atribuye al aislamiento geográfico la diferenciación entre las mismas. Asimismo Santucci y cols. (1997) al analizar distintas poblaciones europeas del género *Austropotamobius* detectan diferencias interpoblacionales, encontrando que las dos poblaciones españolas que incluyen en el estudio (del Guadalquivir y Ebro, respectivamente) se relacionan genéticamente con las del norte de Italia.

Mediante aloenzimas Attard y Vianet (1985) obtuvieron valores de F_{ST} de 0,90 en poblaciones europeas de *A. pallipes*. En esta misma especie Santucci y cols. (1997) también en poblaciones europeas, encontraron valores de F_{ST} muy bajos, 0,10 que explicaron por el mismo origen geográfico de las poblaciones estudiadas. En un trabajo posterior sobre la estructura de las poblaciones en Suiza se encontraron valores altos de F_{ST} (0,89) y mínimos de Nm (Lörtscher *et al.*, 1998). Es decir, la información poblacional europea, cuando las muestras tienen orígenes geográficos distintos evidencian, también, valores elevados de diferenciación genética.

La estructura poblacional y la reciente historia de las poblaciones de *A. pallipes* marcada por diferentes causas de regresión como las introducciones de especies alóctonas, la afanomicosis y las alteraciones antrópicas, han llevado a la fragmentación de las poblaciones del cangrejo de río en nuestro país en las últimas décadas. Además, buena parte de las poblaciones han sufrido diversos cuellos de botella que acentúan la deriva genética, conducen a la reducción de la variabilidad genética y a la diferenciación de las poblaciones, y, a largo plazo, fijan alelos alternativos en diferentes poblaciones (Holdich, 1988). Dentro de la misma especie, la existencia de poblaciones grandes y comunicadas entre sí debería conducir a una menor diferenciación de las poblaciones y a una mayor diversidad en ellas. Por el contrario, la existencia de poblaciones pequeñas y aisladas debería conducir a la existencia de divergencia entre poblaciones y

homogeneidad dentro de las mismas (Lin *et al.*, 1999). No podemos tampoco olvidar que esos procesos históricos recientes han ejercido sus efectos sobre otros procesos históricos lejanos (fragmentaciones y recolonizaciones posteriores durante la última glaciación, formación de las cuencas endorreicas terciarias). Estos fenómenos están bien documentados en varios organismos, tanto vegetales como animales (Hewitt, 1996).

Mención especial merece la muestra del sur de Italia (COS), que presenta mucha menor similitud que las poblaciones españolas entre sí, lo que implica que estas últimas están genéticamente más relacionadas entre ellas que con la población de la Región de Calabria (COS). Si atendemos a las distancias genéticas, los valores más elevados los encontramos entre la muestra italiana (COS) y las poblaciones españolas (entre 0,41 y 0,74, con una media de 0,53) (Tabla 43). Estos datos, como ya hemos comentado, hay que tomarlos con precaución debido al tamaño poblacional, pero no obstante tienen un valor indicativo de la clara diferenciación de la muestra italiana respecto al conjunto de las españolas. Recordemos que se trata de una muestra del sur italiano y que otros autores, sin embargo, han afirmado relaciones estrechas entre poblaciones españolas y otras del norte de Italia (Santucci *et al.*, 1997; Grandjean *et al.*, 2001). Seguramente resultaría de gran interés un estudio amplio de muestras italianas y españolas, que ayudaran a un mejor conocimiento y al esclarecimiento de las relaciones y el origen de nuestros cangrejos.

En definitiva, los patrones de distribución de la variabilidad genética observada en nuestras poblaciones, evidencian cierto grado de diferenciación genética entre ellas, más acusado en la población del noreste peninsular, y mucho más en la comparación con la muestra de Italia.

Esta información, creemos, puede resultar relevante para las Administraciones y gestores conservacionistas ya que puede ayudar en el

diseño de programas de recuperación (en función de información genética fiable) para restaurar las poblaciones de cangrejo de río.

4.4 RELACIONES FILOGENÉTICAS

Como se ha dicho en los apartados anteriores los resultados obtenidos indican cierto grado de diferenciación entre las poblaciones españolas de cangrejo, *A. pallipes*, analizadas a lo largo de este estudio.

Las distancias genéticas de Nei (Tabla 43) muestran valores que oscilan entre 0,07 y 0,27, con una media de 0,17. En general, los valores de distancias obtenidos están en concordancia con los encontrados por otros autores entre poblaciones de cangrejo de río. Zarazaga (1993) observó valores de 0,002 entre las poblaciones españolas de cangrejo autóctono y de 0,133 entre una población española (Matarraña, Teruel) y una francesa (Trabassac). Attard y Vianet (1985) estudiando diferencias interpoblacionales de *A. pallipes* obtuvieron valores entre 0,003 y 0,27, en poblaciones insulares de Irlanda y Córcega. Santucci y cols. (1997), en poblaciones europeas del género *Austropotamobius* obtuvieron valores de distancias genéticas de Nei entre 0,26 y 0,40, con una media de 0,30; la distancia entre las poblaciones analizadas del centro-norte de Italia y las españolas fue de 0,05. Algo más bajos son los valores encontrados en poblaciones de Europa con ADNmt, entre las que se encuentran 14 poblaciones españolas, 1 francesa, 2 italianas y 1 población eslovaca, entre 0,0003 y 0,164 (Grandjean *et al.*, 2001). Destaca en este trabajo el valor tan bajo de distancia genética entre las poblaciones españolas y las del norte de Italia (Fosso de Ferfereta) 0,0003, resaltando la estrecha relación que existe entre ellas. Algunos autores defienden que las poblaciones de *A. pallipes* de la Península Ibérica proceden de introducciones realizadas desde el norte de Italia, en una fecha aún por precisar, pero probablemente entre el siglo XVII y principios del XIX (Royo *et al.*, 2003).

Los valores de distancia genética más elevados, en general, son los que presenta la población del Arroyo Santa Margarida (GIR) del noreste peninsular con el resto (con un valor medio de 0,23) y la población granadina de Arroyo Ermitas (GRA) con las demás poblaciones (con un valor medio de 0,18), mientras que los más bajos los encontramos entre la población del Arroyo Pozuelo (POZ) de la región centro-este y el resto (valor medio de 0,14).

El análisis de las relaciones poblacionales del cangrejo de río en España a través de los análisis de componentes principales (Figuras 20 y 21) y dendrogramas (Figuras 24, 25 y 26) elaborados a partir de las distancias genéticas de Nei y de los índices de similitud, nos han permitido extraer algunas conclusiones. Tanto el análisis de componentes principales como los dendrogramas muestran dos grupos diferenciados dentro de las poblaciones españolas, uno formado por la población de Gerona, A. Santa Margarida (GIR), y el otro, por las demás poblaciones. Con respecto a este segundo grupo, por un lado se observa que, poblaciones de una misma cuenca hidrográfica se encuentran separadas en clados diferentes y, por otro lado, que algunas poblaciones se agrupan por proximidad geográfica, pese a pertenecer a diferentes cuencas. Así, encontramos dos agrupamientos que se repiten en todos los casos. Por un lado, las poblaciones de RIL, VIL, GUZ, MAD, NAV y POZ. Y, por otro lado, las poblaciones de CUE, LEO, GRA y PVS.

De manera muy general se observa que las poblaciones quedan agrupadas por vertientes. Así, las poblaciones de la vertiente atlántica y las de la vertiente mediterránea forman sendos grupos, con dos excepciones, las poblaciones atlánticas de POZ (A. Pozuelo) y MAD (M. Madalena) que se incluyen dentro del grupo de las mediterráneas, posiblemente por proximidad geográfica con éstas.

Las poblaciones de A. Santa Margarida (GIR) y A. Ermitas (GRA) son las más distantes genéticamente y geográficamente están separadas por 778 kms. Además, en todos los casos se repiten varios emparejamientos entre poblaciones. Dos poblaciones de la región centro-norte, GUZ (cuenca del Ebro) y MAD (cuenca del Duero); y otra pareja formada por las poblaciones de RIL, Astacifactoría, y VIL (cuenca del Júcar), del centro-este de la Península. Aun cuando el test de Mantel no muestra relación significativa entre las distancias geográfica y genética ($r=0,47$, $p[Z \text{ al azar} \leq Z \text{ observado}] = 0,01$), no podemos pasar por alto que el menor valor de distancia genética, de 0,07, se da entre las poblaciones de A. Guztar (GUZ) y M. Madalena (MAD), que distan pocos kilómetros geográficamente (51 km), pertenecen a las cuencas del Ebro y Duero respectivamente, y son de la misma provincia (Burgos). Para explicar este punto es necesario discutir la capacidad de dispersión de la especie *A. pallipes*. El cangrejo de río, al contrario que otras especies de cangrejos de agua dulce como el cangrejo rojo (*P. clarkii*) del que se tiene constancia de desplazamientos de varios kilómetros, no es capaz de desplazarse grandes distancias fuera del agua. Ya se ha comentado en varias ocasiones a lo largo de este trabajo que las poblaciones de *A. pallipes* se encuentran fragmentadas y aisladas del resto de la red fluvial, es decir, que los animales no podrían migrar por sí solos. Además, las poblaciones se encuentran, por lo general, en lugares de difícil acceso y se tiene constancia del traslado artificial de los cangrejos de unos sistemas fluviales a otros, por parte de los guardas (Pardo, 1942; Torre y Rodríguez, 1964, entre otros).

Como acabamos de comentar Arroyo Santa Margarida (GIR) y Arroyo Ermitas (GRA) son las más distantes genéticamente del resto de las poblaciones españolas. Santucci y cols. (1997) encontraron que la población del Guadalquivir distaba genéticamente del resto de poblaciones europeas analizadas, excepto de las del norte de Italia y la del Ebro, además de

encontrarse entre los niveles de variabilidad más elevados de las 35 poblaciones que analizaron. Así pues, las poblaciones de A. Santa Margarida (GIR) y A. Ermitas (GRA) puede ser que sobrevivieran a los cambios ambientales de las últimas glaciaciones actuando como refugios y lleven más tiempo establecidas que las otras poblaciones españolas analizadas en este estudio. Pero se tiene la certeza de que en la década de los años 30 se realizó una introducción de cangrejo de río con éxito en Olot (Gerona) y desde entonces vive perfectamente aclimatado, al igual que en otras regiones de España como el río Miera (Cantabria) y el Lago Enol (Asturias) (Pardo, 1942). No se dispone de la información acerca de la procedencia de los ejemplares empleados la introducción de Olot pero, por su proximidad, puede que se trajeran de Francia, del mismo modo que en el siglo XIX fueron llevados ejemplares desde España e Italia a este país para combatir los efectos producidos por la peste del cangrejo (Grandjean *et al.*, 1997b; Lörtscher *et al.*, 1997; Santucci *et al.*, 1997).

Los resultados obtenidos al introducir en los análisis la muestra del sur de Italia (COS) no modifican la topología general de los árboles observada al analizar únicamente las poblaciones españolas. En los dendrogramas en los que se incluyen todas las poblaciones (Figuras 27, 28 y 29) observamos que la muestra italiana es la primera en separarse del resto. Se repiten los mismos agrupamientos de las poblaciones españolas (ver Figuras 24, 25 y 26). El hecho de que se obtenga la misma topología con los distintos métodos y algoritmos (distancias genéticas de Nei e índices de similitud), en las poblaciones de *Austropotamobius pallipes*, hace que los resultados gocen de una gran fiabilidad. Además, los valores de *bootstrap* obtenidos en los dendrogramas están, en casi todos los casos, por encima de 500. Según Felsenstein (1988), para asegurar que un agrupamiento sea legítimo, éste debe ocurrir al menos en la mitad de las estimas de *bootstrap*

(valores por encima de 500), lo que apoya la idea de que las poblaciones son genéticamente diferentes y la separación entre las mismas es consistente.

A la hora de llevar a cabo este estudio se intentó tomar muestras de las que, en principio, se tenía la seguridad eran poblaciones naturales. A pesar de este intento, algunas pueden, o no, ser introducciones antiguas no conocidas por la Administración o simplemente poblaciones de las que no se disponga de ninguna documentación acerca de su introducción. Ya hemos comentado a lo largo de este trabajo que se sabe poco sobre la evolución de dichas poblaciones. Pero el hecho general de que no exista una relación genética-geográfica ni genética-hidrográfica clara puede estar en relación con, por un lado, los movimientos pasivos de individuos de unos lugares a otros realizados por el hombre con el fin de perpetuar las poblaciones de cangrejo autóctono, y, por otro lado, con las fragmentaciones. Las poblaciones de cangrejo a lo largo de las últimas décadas han estado sometidas a fragmentaciones, como ya hemos comentado, que han propiciado probablemente pequeños tamaños efectivos en muchos casos y endogamia, posiblemente como consecuencia de los múltiples cuellos de botella donde la deriva genética ha podido jugar un papel muy importante. Estos cuellos de botella que han atravesado las poblaciones podrían deberse principalmente a las diferentes causas que han conducido a la regresión del cangrejo de río en nuestro país, entre las que se encuentran las alteraciones producidas por el hombre sobre el hábitat, la afanomicosis y la introducción de especies exóticas de cangrejos (Diéguez-Uribeondo *et al.*, 1977b; Alonso *et al.*, 2000; Galindo *et al.* 2000).

4.5 VARIABILIDAD MORFOMÉTRICA

Los métodos clásicos utilizados para estudiar la variabilidad de una especie se han basado en caracteres morfológicos y merísticos. Precisamente, la información básica para el conocimiento de una especie de interés desde un punto de vista ecológico y de la conservación, reside en su estructura poblacional, en la variabilidad y diversidad contenidas en sus poblaciones, tanto a nivel genotípico como fenotípico. La disminución del número de ejemplares de cangrejo autóctono y su inclusión como especie amenazada en la categoría de “vulnerable”, implican la necesidad de establecer una política de gestión adecuada para protegerla. En España, con respecto a la morfometría de la especie *A. pallipes* sólo se han llevado a cabo tres trabajos que incluyen poblaciones, todos ellos, dentro de un rango geográfico muy estrecho (Celada *et al.*, 1987; Gómez de Diego, 1991; Iglesias *et al.*, 1998). Así pues, el presente estudio es el primer trabajo sobre el cangrejo de río en nuestro país que recoge una información geográfica amplia, ocho cuencas hidrográficas diferentes y en el que, a través de 14 medidas morfométricas, se estudia la estructura poblacional de la especie en un total de 435 individuos (248 machos y 187 hembras).

El análisis descriptivo de la especie, *A. pallipes*, ha mostrado valores superiores de la media, mediana, moda, desviación típica, varianza, máximos y mínimos de todas las variables morfométricas en los machos que en las hembras (Tablas 50 y 51). Estos resultados son consistentes con la descripción del crecimiento de los Crustáceos publicada por Hartnol (Reynolds, 2002), en general, y con los Decápodos en particular, como en las especies *Astacus astacus* (Agerberg, 1988; Fevolden y Hessen, 1989), *Astacus leptodactylus* y *Pacifastacus leniusculus* (Agerberg, 1988).

El tamaño de los cangrejos de río, en general, se expresa mediante dos variables morfométricas fácilmente medibles, la longitud del cefalotórax (LCF) y la longitud total (LT) (ver Figura 9). La longitud de cefalotórax (LCF), se emplea con fines científicos, mientras que la longitud total (LT) con fines comerciales y de captura, como la talla de los ejemplares (Holdich, 1988).

Los valores registrados en nuestro estudio, en el que no se especifican clases de edad, son de 3,74 cm para la LCF (longitud de cefalotórax) y 7,53 cm para la LT (longitud total) en los machos, y de 3,55 cm y 7,40 cm para LCF y LT, respectivamente, en las hembras de cangrejo de río. Estos valores se encuentran dentro del rango registrado (aunque ligeramente inferiores) para la especie por otros autores. Así, Pratten (Holdich, 1988) cita valores, para diferentes clases de edad, que oscilan entre 7,23 y 8,05 cm de LT en los machos y entre 3,38 y 3,88 cm de LCF, mientras que los valores de LT se encuentran entre 6,83 y 7,64 y en el caso de LCF entre 3,14 y 3,63 cm en las hembras. Por otro lado, Laurent (Holdich, 1988) para diferentes clases de edad presenta datos de longitud total (LT) en el caso de los machos entre 6,75 y 9,25 cm y en las hembras da valores entre 5,90 y 6,75 cm.

Del mismo modo, en nuestro estudio sobre el cangrejo de río en España, al aplicar las pruebas de Mann-Whitney y de Student a las 14 variables morfométricas, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre machos y hembras en todas ellas excepto en la longitud total (LT), y en dos medidas referidas al rostro, longitud y anchura de la base del rostro (LROS y ABASROS, respectivamente) (ver Tabla 52).

Estas diferencias significativas entre ambos sexos en cuanto al peso, longitud y anchura de cefalotórax (ACF, LCF), longitud y anchura de las pinzas (ILPINZA, IAPINZA, DLPINZA, DAPINZA), documentadas en gran cantidad de estudios (Grandjean *et al.*, 1997c; 1997d; Reynolds, 2002) eran predecibles por tratarse de caracteres sexuales secundarios con importantes

funciones de tipo biológico. Dichas funciones están relacionadas con la reproducción, combate y defensa frente a los predadores, así como con la captura de presas (Stein, 1976).

Al comparar el número de individuos de este trabajo con el empleado en otros estudios morfométricos llevados a cabo en el cangrejo de río, *A. pallipes*, observamos que nuestro caso es el más amplio en lo que respecta al número de individuos procedentes de poblaciones naturales analizados morfométricamente, 435 ejemplares. En nuestro país, Celada y cols. (1987), en un estudio morfométrico comparativo entre dos poblaciones, una de ellas natural de cangrejo autóctono y otra semi-controlada de cangrejo señal, emplearon 346 ejemplares. Gómez de Diego (1991) analizó 523 ejemplares de seis poblaciones; sólo dos de ellas eran naturales, el resto vivían en sistemas acuáticos artificiales. Y por último, Iglesias y cols. (1998) también realizaron un estudio morfométrico comparativo en 140 ejemplares de cangrejo autóctono procedentes de distintos lugares de la cuenca del río Miño.

Ya fuera de nuestras fronteras, Attard y Vianet (1985) analizaron un total de 142 individuos en cinco poblaciones europeas, entre 23 y 35 individuos por población. En 1998, 60 individuos de *A. pallipes* pertenecientes a cuatro poblaciones europeas (15 individuos en cada población) fueron analizados morfométricamente por Grandjean (Grandjean *et al.*, 1998). Igualmente Mori y cols. (2001) llevaron a cabo un estudio morfométrico de cinco poblaciones del noroeste de Italia, desde 11 hasta 119 individuos por población, en un total de 211 individuos.

Se ha observado, por medio del análisis de cada población de *A. pallipes*, valores más elevados de la media, mediana, moda, desviación típica, varianza, máximos y mínimos de las variables morfométricas en los machos

que en las hembras (Tablas 46, 47 y 48), de la misma forma que hemos observado para el conjunto poblacional.

Atendiendo a los valores de las variables morfométricas por poblaciones, observamos que en todos los casos, tanto al analizarlas en su conjunto como de forma separada por sexos (machos y hembras), los valores más elevados siempre recaen en los individuos de la población de la Astacifactoría, RIL. Todas las variables morfométricas en esta población presentan valores por encima de la media. Así, el promedio de la longitud del cefalotórax (LCF) en hembras en la Astacifactoría de Rillo es de 4,89 cm (siendo la media de todas las poblaciones de 3,55 cm) y el promedio de la longitud total (LT) es de 9,92 cm (siendo la media de todas las poblaciones de 7,40 cm). Por el contrario, los datos más bajos, generalmente, los encontramos en la población de A. Pozuelo (POZ) cuyos promedios están por debajo que los establecidos en el conjunto de las once poblaciones analizadas. El valor medio de la longitud del cefalotórax (LCF) en los machos de esta población (POZ) es de 3,28 cm y el promedio general para las once poblaciones de 3,74 cm, mientras que la LT presenta un valor de 6,57 y la media en todas las poblaciones españolas analizadas es de 7,53 cm.

Nuestros resultados se corresponden con diversos estudios morfométricos comparativos entre poblaciones de *A. pallipes* en los que se observa que los valores de las variables morfométricas, en general, se encuentran en los mismos rangos que los obtenidos en nuestro estudio, y en particular, los de LT (longitud total) y LCF (longitud de cefalotórax). En Celada y cols. (1987) para diferentes clases de edad, encontramos valores promedio de longitud total de 6,66 cm (entre 2,29 y 9,90 cm) y de 3,30 cm en longitud de cefalotórax (entre 1,08 y 5,05 cm), para machos, y valores promedio de 6,18 (entre 2,23 y 9,00 cm) y 2,90 cm (entre 1,06 y 4,31 cm) de LT y LCF, respectivamente, para hembras del cangrejo de río en nuestro país. Iglesias y cols. (1998) registran, sin especificar clases de edad, valores dentro

del mismo rango que en el caso anterior en ejemplares de la cuenca del río Miño, 8,62 y 8,19 cm para la longitud total y 4,23 y 3,82 cm en la longitud de cefalotórax, en machos y hembras respectivamente.

El crecimiento de los cangrejos es alométrico, es decir, que ciertas partes del cuerpo crecen desproporcionadamente en relación con otras. Y en los cangrejos el dimorfismo sexual externo de los caracteres secundarios es aparente sólo cuando se ha alcanzado la madurez sexual. Así, las pinzas en los machos y el abdomen en las hembras (para portar los huevos) crecen más rápido que otras partes del cuerpo. El crecimiento de las pinzas es casi isométrico en los individuos juveniles y en las hembras, sin embargo en los machos el nivel de alometría aumenta al mudar en la pubertad. Por otro lado, mientras que el crecimiento del abdomen es isométrico en los machos y juveniles, en las hembras crece alométricamente al mudar en la pubertad (Reynolds, 2002).

En general, el tamaño de las hembras es menor que el de los machos por dos razones. En primer lugar, la frecuencia de la muda es inferior en hembras que en machos, ya que las hembras no pueden mudar mientras portan los huevos. Y en segundo lugar, la tasa de crecimiento en cada muda también es menor en hembras como consecuencia de la demanda energética derivada del transporte de los huevos a la que se suma la escasa actividad alimenticia durante este período (Reynolds, 2002).

El análisis del dimorfismo sexual en las 14 variables morfométricas medidas en las once poblaciones españolas de cangrejo autóctono, *A. pallipes*, a través del análisis MLG univariante, mostró que todas las ellas variaban entre sexos, excepto la longitud total (LT) (Tablas 53 y 54) al igual que en el estudio de Iglesias y cols. (1998). Este mismo comportamiento también se repite cuando se lleva a cabo el análisis de las poblaciones agrupadas por

cuencas (Tablas 55 y 56) y, del mismo modo, al analizar las poblaciones agrupadas en vertientes (Tablas 57 y 58).

En general, en los tres análisis llevados a cabo, por poblaciones, cuencas y vertientes, se observa el mismo patrón de variación. En ambos sexos se repite la elevada variabilidad en las pinzas (anchura y longitud) y en las medidas del rostro (longitud del rostro y anchura de la base del rostro).

Existe, por tanto, una gran variabilidad en ambos sexos en lo que respecta a las variables morfométricas de los individuos de *A. pallipes* estudiados, tanto al analizarlos por poblaciones como por cuencas y vertientes. No podemos olvidar que al realizar estos análisis por cuencas y vertientes el número de individuos en cada uno de estos grupos es mayor con respecto al análisis por poblaciones, repitiéndose los mismos resultados para las pinzas (anchura y longitud), en los machos, y en las medidas del rostro en ambos sexos.

El análisis MLG (modelo lineal general) univariante muestra cierto grado de diferenciación morfométrica entre las poblaciones españolas de *Austropotamobius pallipes* analizadas (Tablas 53 y 54). Grandjean y cols. (1997d) encontraron diferenciación morfométrica entre tres poblaciones francesas, de manera más clara en las hembras que en los machos. También Attard y Vianet (1985), pudieron diferenciar morfométricamente poblaciones de cangrejos, bastante distantes geográficamente, procedentes de Irlanda, Francia y Córcega. Sin embargo, al contrario que en los estudios anteriores y en el nuestro, Mori y cols. (2001) apenas encuentran diferenciación morfométrica interpoblacional en poblaciones de *A. pallipes* de Liguria, norte de Italia.

Por otro lado, a partir de las variables morfométricas se llevó a cabo un análisis de componentes principales, en primer lugar con todos los individuos en su conjunto, en segundo lugar con las hembras y, por último,

con los machos. Hemos encontrado tres morfotipos diferentes que se repiten en cada uno de los tres análisis, dos de los cuales pueden agruparse en uno solo que englobaría a la mayoría de las poblaciones españolas analizadas.

El primer morfotipo se caracteriza por el peso (más elevado) de los individuos y está representado por la población de la Astacifactoría de Rillo de Gallo (RIL). Se incluye en este grupo, aunque no de una forma tan clara como la Astacifactoría, RIL, a la población de Río Ega (NAV).

El segundo morfotipo, caracterizado por las variables (de valores más bajos) longitud y anchura del cefalotórax (LCF y ACF) y anchura de la base del rostro (ABASROS), está representado por la población de POZ (A. Pozuelo). Es el morfotipo más abundante de los descritos y en él se agrupan las restantes poblaciones españolas de cangrejo de río (LEO, CUE, GIR, GRA, GUZ, MAD, PVS y VIL).

Así pues, dentro del primer morfotipo siempre aparece la población de la Astacifactoría en solitario, caracterizada en todos los casos por el peso y las variables relativas a longitud y anchura de las pinzas (ILPINZA, IAPINZA, DLPINZA, DAPINZA), y en el caso de las hembras además, por la longitud y anchura del cefalotórax (LCF y ACF, respectivamente), cuyos valores son un 25% superiores a los promedios del resto de poblaciones.

Dentro de los factores ambientales que influyen en el crecimiento de los cangrejos se encuentran, por un lado, factores abióticos y, por otro, factores bióticos. Entre los abióticos se incluyen la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto, los nutrientes, la calidad del agua y la composición del hábitat. De todos ellos, la temperatura y el oxígeno disuelto en el agua, además del alimento disponible y el fotoperíodo, son los que más influyen sobre dos de los componentes del crecimiento: la frecuencia y la tasa de crecimiento de la muda. Y entre los factores bióticos se encuentran la densidad poblacional, el alimento disponible y la depredación.

En la Astacifactoría de Rillo de Gallo (RIL), en Guadalajara, se crían y reproducen en cautividad ejemplares de la especie *A. pallipes*, disponiéndolos convenientemente y facilitándoles la alimentación y cuidados adecuados. Estas condiciones, diferentes de las condiciones en las que se encuentran el resto de poblaciones, que viven en estado natural, deben estar influyendo en su forma de crecimiento. En la Astacifactoría de Rillo (RIL) los ejemplares se distribuyen según una densidad de 10-15 individuos/m² y son alimentados diariamente con una dieta de hígado y patata. En estas condiciones la frecuencia y tasa de crecimiento de las mudas probablemente son más elevadas que en las poblaciones naturales, lo que se puede traducir en el mayor tamaño observado que presentan los individuos de la Astacifactoría.

Basándonos en los datos que hemos obtenido y de manera muy general, no se observa una relación geográfica clara entre las poblaciones ni tampoco un patrón claro a través de las cuencas hidrográficas, pero a pesar de ello, la población de la Astacifactoría de Rillo (RIL) siempre aparece diferenciada del resto y, en todos los casos, las poblaciones restantes se agrupan mayoritariamente dentro del morfotipo representado por la población de Arroyo Pozuelo (POZ).

La utilización de caracteres morfométricos ha resultado ser una herramienta muy útil, por un lado en la detección de variabilidad fenotípica y por otro lado, en el conocimiento de la estructura poblacional de la especie *A. pallipes*. En conjunto, los datos morfométricos evidencian cierto nivel de variabilidad fenotípica morfométrica y alguna diferenciación poblacional.

4.6 GENÉTICA Y MORFOMETRÍA

En nuestro trabajo se ha estudiado la estructura poblacional del cangrejo de río, *Austropotamobius pallipes*, y para ello se han analizado, por un lado y mediante la técnica RAPD-PCR, 11 poblaciones españolas

pertenecientes a 8 cuencas hidrográficas diferentes y una muestra italiana, de la Región de Calabria (COS), en un total de 285 individuos. Por otro lado, se han analizado 14 variables morfométricas en un total de 435 individuos de *A. pallipes* pertenecientes a las mismas 11 poblaciones españolas. Se trata, en conjunto, del primer estudio molecular y morfométrico de estas características que se lleva a cabo en nuestro país con el cangrejo de río.

Los datos procedentes del empleo de técnicas moleculares, junto con estudios más exhaustivos sobre las clasificaciones basadas en caracteres morfológicos, podrán en lo sucesivo ir perfilando una mejor y más correcta clasificación de las poblaciones del cangrejo de río, e intentar contribuir al esclarecimiento de la controversia que existe acerca de la posibilidad de considerar la especie como nativa o introducida en una fecha aún por determinar.

Nuestros resultados muestran, por una parte, la gran utilidad de la técnica de RAPD-PCR para detectar variación en poblaciones incluso con sospecha de bajos niveles de variabilidad, como es el caso que nos ocupa, frente a estudios genéticos mediante otros marcadores como isoenzimas y ADN mitocondrial. Por otra parte, el uso de marcadores moleculares en el establecimiento de relaciones filogenéticas aporta una gran cantidad de información, que presenta probablemente una menor subjetividad que los aportados por los caracteres morfológicos.

En este trabajo mediante el empleo de dos tipos diferentes de marcadores, moleculares (RAPD) y morfométricos, hemos visto que las poblaciones de *A. pallipes* en nuestro país muestran cierta cantidad de variabilidad, tanto genética como fenotípica; en ambos casos hay diferenciación poblacional; y, en tercer lugar, las poblaciones no siguen un patrón de agrupamiento claro, ni hidrográfico ni geográfico, tanto desde el punto de vista genético como desde el punto de vista morfométrico, lo que podría tener diversas explicaciones posibles.

Lo que se esperaría en poblaciones de río y con poca capacidad de dispersión, como es el caso del cangrejo autóctono, es un agrupamiento por cuencas hidrográficas. Este mismo patrón también se ha encontrado en otros países de Europa, como Suiza. Lörtscher y cols. (1997, 1998) proponen que los grupos así formados representarían entidades naturales resultado, por un lado, de la deriva genética en pequeñas poblaciones aisladas y, por otro lado, de la reciente influencia humana, implicando movimientos de cangrejos de unas cuencas a otras a través del hombre. Según Lörtscher (Lörtscher *et al.*, 1997, 1998) esta sería la hipótesis más probable para explicar que las poblaciones no sigan un patrón de agrupamiento hidrográfico, puesto que los cangrejos han supuesto una importante fuente de alimentación desde la Edad Media en Suiza, y el actual patrón de distribución de la especie sería consecuencia de las actuaciones humanas. Sin embargo, para el caso de nuestro país, hay una carencia de información histórica acerca del cangrejo y únicamente encontramos documentación desde 1783 (Bolea, 1995) y 1850 (Madoz, 1850-1853).

Otros autores tratan de explicar la estructura genética de las poblaciones de *Austropotamobius pallipes* en la Península Ibérica (Grandjean *et al.*, 2001) postulando, por un lado, la procedencia de las poblaciones españolas desde Italia, debido a la escasa distancia genética encontrada en su trabajo entre las poblaciones del norte de Italia y las españolas. Anteriormente Laurent (1988) ya había barajado esta idea. Efectivamente, los movimientos de poblaciones de cangrejos efectuados por el hombre entre distintos países de Europa han sido comunes y están documentados (Grandjean *et al.*, 1997b; Lörtscher *et al.*, 1997; Santucci *et al.*, 1997). Por ejemplo, en el siglo XIX se llevaron a Francia poblaciones italianas y españolas con el fin de combatir los efectos producidos por la peste del cangrejo en ese país. Estos mismos autores argumentan que la estructura que

se observa en las poblaciones españolas de cangrejo de río hace referencia a la fragmentación que han sufrido dichas poblaciones en las últimas décadas, viéndose reducidas tanto en número como en tamaño, encontrándose actualmente confinadas a las cabeceras de los ríos (Alonso *et al.*, 2000). Los motivos que han conducido a las poblaciones de cangrejo autóctono a esta situación han sido la destrucción del hábitat a través de canalizaciones, la sobrepesca, la peste o afanomicosis y la introducción de especies de cangrejos alóctonas, fundamentalmente la del cangrejo rojo (*P. clarkii*).

En tercer lugar postulan un drástico cuello de botella que se remonta al Pleistoceno y que ha podido influir en la estructura genética actual de *A. pallipes*, al igual que en otras especies europeas. Hewitt (1996) argumenta que la mayoría de las especies europeas muestran haplotipos pertenecientes a tres tipos, relacionados con la existencia de tres refugios glaciales distintos, los Balcanes, Italia y la Península Ibérica. La objeción que presentaría esta hipótesis es la falta de divergencia genética entre las poblaciones españolas apuntada por Santucci y cols. (1997), Grandjean y cols. (1997b) y Grandjean y Souty-Grosset (2000); por el contrario, nuestros resultados genéticos y morfométricos, sí muestran divergencia poblacional. Y por último, aluden a la peste del cangrejo producida por el hongo *Aphanomyces astaci* que habría provocado una fuerte caída de las poblaciones de *A. pallipes* en los últimos 20 años en España, superior al resto de Europa, conduciendo a la reducción de la cantidad de variabilidad genética en estas poblaciones y de variabilidad fenotípica morfométrica.

Entre las posibles explicaciones acerca de la estructura y distribución de las poblaciones de cangrejo de río en nuestro país podría estar, en primer lugar, que la distribución que observamos hoy en día de las poblaciones de cangrejo no refleje la distribución de las cuencas fluviales actuales sino que

esté en función de las cuencas endorreicas terciarias, como en el caso de otros organismos de agua dulce como el género *Barbus sclateri* (Callejas, 2002).

Por otro lado, pueden aparecer agrupadas poblaciones que pertenecen a diferentes cuencas hidrográficas debido a capturas fluviales, como podría suceder en las poblaciones de A. Guztar (GUZ), R. Ega (NAV) y M. Madalena (MAD) (las dos primeras de la cuenca del Ebro y la tercera de la cuenca del Duero) que aparecen agrupadas en todos los dendrogramas realizados. De hecho, la observación orográfico-fluvial de esas zonas evidencia esta posibilidad.

De otra parte, puede que el patrón actual sea fruto, en su mayor parte, de los movimientos que han venido experimentando o de los que han sido objeto los individuos de la especie *A. pallipes* en España, fruto del interés por evitar la desaparición de la especie. En un principio cabría esperar, por la capacidad de movimiento de la especie, un modelo de dispersión por distancia, pero no es este el caso, como evidencia estadísticamente el test de Mantel.

Y por último, es posible que la actual distribución de las poblaciones de *A. pallipes* españolas se deba en parte a las tres posibilidades apuntadas, capturas fluviales, distribución en función de las cuencas endorreicas terciarias y movimientos pasivos realizados a través del hombre.

Si se aceptara la hipótesis de que la especie *Austropotamobius pallipes* no fuese nativa, tal y como se pensaba hasta hace pocos años, la cantidad de variabilidad de las poblaciones españolas tendría que ser inferior a la registrada para la especie en otras zonas de Europa donde se tiene constancia de que habita desde hace mucho más tiempo, y esto no sucede, puesto que los niveles de variabilidad que hemos detectado (tanto genéticos como morfométricos) están dentro del mismo rango que los observados en otras

poblaciones europeas, e incluso son de los más elevados. Lo cual nos llevaría a apoyar la idea clásica de su presencia hace tiempo en la Península Ibérica.

Los patrones de distribución de la variabilidad genética observada en nuestras poblaciones, evidencian cierto grado de diferenciación entre ellas, por un lado claramente diferenciada del resto la población de la Astacifactoría de Rillo, por otro y con una diferencia más acusada la población del noreste peninsular, y todavía más con la comparación con la muestra de Italia. Resulta curioso que la población del noreste sea la más diferenciada del resto, y que este patrón se observe también en otras especies dulceacuícolas como en el género *Barbus*. La región resulta peculiar porque ha estado sometida a un largo período de aislamiento y presenta unas condiciones ambientales distintas por ser una zona montañosa.

De manera muy general no se observa una relación geográfica clara entre las poblaciones ni tampoco un patrón claro a través de las cuencas hidrográficas, pero a pesar de ello, desde el punto de vista genético las poblaciones de GIR (A. Santa Margarida), RIL (Astacifactoría) y COS (Coscile) siempre aparecen diferenciadas del resto, y desde el punto de vista morfométrico la población de RIL en todos los casos se diferencia de las demás poblaciones. El hecho general de que no exista una relación genético/morfométrico-geográfica ni genético/morfométrico-hidrográfica clara puede estar en relación con, por un lado, los movimientos de cangrejos de unos lugares a otros efectuados por el hombre con el fin de perpetuar las poblaciones de cangrejo autóctono, y, por otro lado, con las fragmentaciones.

Nuestros resultados parecen mostrar que la Astacifactoría de Rillo es una de las poblaciones más adecuadas, desde el punto de vista genético y morfométrico, para posteriores repoblaciones, con el fin de conservar la especie en nuestro país. Otra de las posibles candidatas para llevar a cabo las repoblaciones sería la población del R. Ega (NAV) por los elevados niveles de

variabilidad genética. De estas dos poblaciones debemos tener en cuenta que la Astacifactoría de Rillo se dedica única y exclusivamente a la producción de cangrejos, no con fines comerciales sino de restauración de poblaciones a escala regional. Así pues habría que contar con la creación de más Astacifactorías en otros puntos del país. Lo ideal sería partir de cangrejos procedentes de la Astacifactoría de Rillo, y si esto no fuera posible, de poblaciones naturales que cuenten con un buen tamaño efectivo, en definitiva, que se encuentren en buen estado. Lo óptimo sería combinar diferentes poblaciones, lo que aumentaría la cantidad de variabilidad en la población de “fusión” y, además, poblaciones diferenciadas, que aumentarían también la “calidad” de la variabilidad en esta población. La posible aparición de vigor híbrido, con las obvias ventajas frente a condiciones adversas, bióticas o abióticas, debe evaluarse a la hora de la toma de decisiones. Y no debemos olvidar el aspecto morfométrico, que, al menos en parte, puede también evidenciar variabilidad poligénica en caracteres de evidente importancia en el valor adaptativo. Ambos aspectos deben, por tanto, evaluarse antes de la toma de decisiones por parte de las Administraciones y gestores a la hora de diseñar programas de recuperación eficaces por medio de los que restaurar las poblaciones de cangrejo de río, *Austropotamobius pallipes*.

Conclusiones

5 CONCLUSIONES

- La técnica RAPD ha demostrado su eficacia en la determinación de la cantidad de variabilidad genética y sus patrones de distribución, así como en la identificación de la especie *Austropotamobius pallipes* en España.
- La técnica RAPD ha permitido la detección de 3 marcadores presentes en todos los individuos de las doce poblaciones analizadas (11 poblaciones españolas y una italiana); estas bandas podrían ser bandas diagnóstico de la especie *Austropotamobius pallipes*.
- La técnica RAPD ha permitido la detección de 40 bandas presentes en todos los individuos de las once poblaciones españolas analizadas; estas bandas podrían ser bandas diagnóstico/identificativas “regionales” de la especie *Austropotamobius pallipes* en nuestro país.
- La cantidad de variabilidad genética observada en las poblaciones españolas de *A. pallipes* se encuentra dentro de los valores normales en los cangrejos de río, con un polimorfismo del 15%.
- La población del Río Ega (NAV) evidencia la mayor cantidad de variabilidad genética para la especie en nuestro país.
- La población de la Astacifactoría de Rillo evidencia una cantidad de variabilidad superior a los valores promedio observados para la especie en nuestro país.
- La única muestra italiana analizada presenta un grado de variabilidad superior al encontrado en las poblaciones españolas.
- Existe un grado significativo de diferenciación genética entre las poblaciones de *A. pallipes* analizadas.
- Dentro de las poblaciones españolas, las más diferenciadas genéticamente del resto son, la población de Gerona y la población de la Astacifactoría.

- Al considerar las doce poblaciones (incluida la muestra de Italia), la diferenciación genética más acusada la encontramos en la comparación con la muestra de Italia.
- Los marcadores morfométricos muestran que existe diferenciación significativa entre los machos y hembras de la especie *Austropotamobius pallipes*, en 13 de las 14 variables morfométricas analizadas.
- Se observa diferenciación poblacional a nivel morfométrico.
- Desde el punto de vista morfológico la población más diferenciada del resto es la de la Astacifactoría de Rillo.
- Se han detectado dos morfotipos diferentes, uno de ellos caracterizado por la población de la Astacifactoría y el otro en el que quedan englobadas el resto de las poblaciones.
- Ambos tipos de marcadores, genéticos y morfométricos, revelan que no existe una relación hidrográfica, por cuencas, ni geográfica clara entre las poblaciones.
- Nuestros resultados evidencian la fragmentación de las poblaciones españolas de *Austropotamobius pallipes*.
- Los datos obtenidos parecen apoyar la idea de la presencia del cangrejo en nuestro país desde hace bastante tiempo, ya que la variabilidad encontrada es similar a la de otras poblaciones europeas, la muestra analizada del sur de Italia es muy diferente de las poblaciones españolas y entre éstas se observa diferenciación.
- Los resultados obtenidos mediante los dos tipos de marcadores, genéticos y morfométricos, deben evaluarse antes de la toma de decisiones por parte de las Administraciones y gestores a la hora de diseñar programas de recuperación eficaces por medio de los que restaurar las poblaciones de cangrejo de río, *Austropotamobius pallipes*, en nuestro país.

Resumen

6 RESUMEN

El cangrejo de río *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) es la única especie autóctona de cangrejo presente en la Península Ibérica y uno de los mayores macroinvertebrados de nuestra fauna continental. Está sometido a diversos factores de amenaza como el escaso número de poblaciones, rangos geográficos estrechos, competencia con otras especies de cangrejos alóctonas, diversas enfermedades y la pérdida de su hábitat por causas humanas. Por ello, los datos genéticos y morfométricos pueden resultar muy útiles, aportando información sobre la estructura poblacional, identificando posibles unidades de conservación y definiendo los hábitats críticos que albergan la mayor parte de la diversidad de la especie.

El cangrejo de río tiene un valor de conservación destacado dentro del contexto europeo estando incluido en la Lista Roja de la U.I.C.N. (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) en la categoría de "vulnerable". Dentro de nuestro país, en el Catálogo Nacional de especies amenazadas se incluye al cangrejo de río como especie "vulnerable" por su tendencia poblacional regresiva que le ha llevado a desaparecer de una gran parte de su área de distribución anterior (BOE nº 149 de 23 de junio de 2003).

Dada la situación que atraviesa el cangrejo de río en nuestro país nos hemos planteado en el presente trabajo mediante la utilización de la metodología RAPD-PCR y marcadores morfométricos, el estudio de sus poblaciones. La combinación simultánea de los marcadores moleculares y morfométricos, permite aprovechar las ventajas que ambos ofrecen para intentar conocer a fondo la estructura poblacional de la especie *Austropotamobius pallipes* en España. Se trata del primer trabajo que recoge información de ocho cuencas hidrográficas diferentes y en el que se utilizan dos metodologías distintas para el estudio poblacional del cangrejo de río autóctono en nuestro país. Este hecho ofrece, por un lado, la ventaja de un

trabajo novedoso y, por otro, la desventaja de la ausencia de otros datos sobre los que apoyarse.

Mediante la técnica RAPD-PCR se han analizado 285 individuos pertenecientes a once poblaciones españolas y una italiana, observándose un total de 133 bandas de amplificación. De las bandas observadas 40 se encuentran presentes en todos los individuos de las once poblaciones españolas analizadas, pudiendo considerarse bandas diagnóstico “regionales”. Por otro lado se han detectado 3 bandas presentes en todos los individuos de las doce poblaciones analizadas (11 poblaciones españolas y una italiana); estas bandas podrían ser bandas diagnóstico, especie-específicas, de la especie *Austropotamobius pallipes*.

En cuanto al análisis de la variabilidad genética, ésta ha revelado que los niveles detectados se incluyen dentro de los rangos observados para los cangrejos de agua dulce en general y de *A. pallipes* en particular, e incluso ligeramente superiores a los promedios.

Los patrones de distribución de la variabilidad genética observada en nuestras poblaciones, evidencian cierto grado de diferenciación entre ellas, más acusado en la población del noreste peninsular, y mucho más en la comparación con la muestra de Italia. Todo ello probablemente es fruto de la antigüedad del establecimiento de la especie en la región y de la fragmentación que las poblaciones han sufrido.

El análisis del dimorfismo sexual en todas las variables morfométricas analizadas en las once poblaciones españolas de cangrejo autóctono, *A. pallipes*, mostró que todas las ellas variaban entre sexos, excepto la longitud total. Todas las variables presentan valores superiores en los machos, tanto por poblaciones como por cuencas y vertientes. En este caso, también, los patrones de distribución de la variabilidad morfométrica muestran cierto grado de diferenciación entre las poblaciones españolas de *Austropotamobius pallipes* analizadas.

Se observan dos grupos diferenciados, dos morfotipos caracterizados por diferentes variables, dentro de las poblaciones analizadas de *A. pallipes* de España, uno de ellos caracterizado por la población de la Astacifactoría, y el más abundante en el que quedan englobadas de forma general el resto de las poblaciones.

No se observa una relación geográfica, ni genética ni morfométrica, clara entre las poblaciones ni tampoco un patrón claro a través de las cuencas hidrográficas, pero a pesar de ello, las poblaciones del noreste peninsular, de la Astacifactoría de Rillo y de Italia siempre aparecen diferenciadas del resto.

No existe una relación genético/morfométrico-geográfica ni genético/morfométrico-hidrográfica clara. Puede estar en relación con, por un lado, los movimientos de cangrejos de unos lugares a otros efectuados por el hombre con el fin de perpetuar las poblaciones de cangrejo autóctono, y, por otro lado, con las fragmentaciones. Las poblaciones de cangrejo a lo largo de las últimas décadas han estado sometidas a fragmentaciones, provocadas por el hombre fundamentalmente, que han propiciado pequeños tamaños efectivos de las poblaciones y endogamia, posiblemente como consecuencia de los múltiples cuellos de botella donde la deriva genética ha podido jugar un papel muy importante. Estos cuellos de botella que han atravesado las poblaciones podrían deberse principalmente a las diferentes causas que han conducido a la regresión del cangrejo de río en nuestro país, entre las que se encuentran las alteraciones producidas por el hombre sobre el hábitat, la afanomicosis y la introducción de especies exóticas de cangrejos.

La información obtenida, creemos, puede resultar de extraordinaria relevancia para la Administraciones y gestores conservacionistas a la hora de diseñar programas de recuperación de las poblaciones de cangrejo autóctono, especie de especial interés en los ecosistemas dulceacuícolas de la Península Ibérica.

Bibliografía

7 BIBLIOGRAFÍA

- AGERBERG, A. 1988. Multivariate analysis of morphometric variation en three species of freshwater crayfish. *Freshwater Crayfish* **8**, 18-28.
- AGERBERG, A. 1990. Genetic variation in three species of freshwater crayfish; *Astacus astacus* L., *Astacus leptodactylus* Aesch., and *Pacifastacus leniusculus* (Dana), revealed by isozyme electrophoresis. *Hereditas* **113**, 101-108.
- ALDABE, J., ESQUIZABEL, J.I., FERNÁNDEZ, M.J., IRURZUN, J.C., MENDÍA, F. RUEDA, A. Y YOLDI, B. 1991. Estudio de distribución y abundancia de las especies de cangrejos presentes en los ríos navarros. Documento interno del Servicio de Medio Ambiente del Gobierno de Navarra. Pamplona.
- ALONSO, F. Y MARTÍNEZ, R. 1998. El cangrejo autóctono en Castilla-La Mancha: Problemática de conservación y recuperación. *Trofeo Pesca* **69**, 58-59.
- ALONSO, F., TEMIÑO, C. Y DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. 2000. Status of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858), in Spain: distribution and legislation. *Bull.Fr. Pêche Piscic.* **356**, 31-54.
- ÁLVAREZ, R. M. 2000. El cangrejo de río y su protección jurídica. *Quercus* **175**, 4.
- ÁLVAREZ, E., AUSÁN, I. Y CABAÑAS, C. 1989. Repoblación con cangrejo señal *Pacifastacus leniusculus* en los territorios de Álava, Vizcaya y Guipúzcoa. Documento interno del Departamento de Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco. Vitoria.
- ATTARD, J. AND PASTEUR, N. 1984. Variabilité et differentiation génétiques chez cinq espèces d'ecrevisses astacidae. *Biochemical Systematics and*

Ecology **12**, 109-117.

- ATTARD, J. AND VIANET, R. 1985. Variabilité génétique et morphologique de cinq populations de l'écrevisse européenne *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet 1858) (Crustacea, Decapoda). *Canadian Journal of Zoology* **63**, 2933-2939.
- AUSTIN, C.M. 1996. Systematics of the freshwater genus *Cherax* Erichson (Decapoda: Parastacidae) in northern and eastern Australia: electrophoretic and morphological variation. *Australian Journal of Zoology* **44**, 259-296.
- AYERRA, J., CIRIZA, F., ESQUIZÁBEL, J.I., IBARRA, J. Y INSAUSTI, J.A. 1986. Estudio de la distribución actual del cangrejo de río, *Austropotamobius pallipes*, en Navarra. Documento interno del Servicio de Medio Ambiente del Gobierno de Navarra. Pamplona.
- BADINO, G. AND ROBOTTI, C. 1978. Probable effect of hatchery conditions on the genetic variability of *Astacus leptodactylus* Aesch. *Freshwater Crayfish* **4**, 257-262.
- BAILLIE, J. AND GROOMBRIDGE, B. 1996. IUCN red list of threatened animals. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, U.K.
- BAKER, N., BYRNE, K., NOORE, S. AND MATHER, P. 2000. Characterization of microsatellite loci in the redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Molecular Ecology* **9**, 494.
- BELFIORE, N.M. AND MAY, B. 2000. Variable microsatellite loci in red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, and their characterization in other crayfish taxa. *Molecular Ecology* **9**, 2231-2234.
- BENITO, C., FIGUEIRAS, A.M., ZARAGOZA, C., GALLEGO, F.J. AND DE LA PEÑA, A. 1993. Rapid identification of *Triticum* genotypes from single seeds using the PCR. *Plant Molecular Biology* **21**, 181-183.

- BIO-RAD LABORATORIES. 1997. Multi-Analyst 1.1. Hercules, California.
- BLACK IV, W.C. 1993. PCR with arbitrary primers: approach with care. *Insect Mol. Biol.* **2**, 1-5.
- BLACK IV, W.C. 1995. FORTRAN programs for the analysis of RAPD-PCR markers in populations. Colorado State University, Ft. Collins.
- BOLEA, L. 1995. El cangrejo de río común en Aragón. Diputación General de Aragón. Zaragoza, 64 p.
- BOTT, R. 1950. Phylogeny and evolution. En: D.M. Holdich, eds.: Biology of freshwater crayfish. Blackwell Science. United Kingdom. Pp. 30-52.
- BROWN, K. 1981. Low genetic variability and high similarities in the crayfish genera *Cambarus* and *Procambarus*. *The American Midland Naturalist* **105**, 225-232.
- BROWN, D. J. AND BOWLER, K. 1978. The relationship between size and age throughout the life cycle in *Austropotamobius pallipes*. *Freshwater Crayfish* **4**, 35-42.
- BUSACK, C. A. 1988. Electrophoretic variation in the red swamp (*Procambarus clarkii*) and white river crayfish (*P. acutus*) (Decapoda: Cambaridae). *Aquaculture* **69**, 211-226.
- CALLEJAS, C. AND OCHANDO, M.D. 2001. Molecular identification (RAPD) of the eight species of the genus *Barbus* (Cyprinidae) in the Iberian Peninsula. *Journal of Fish Biology* **59**, 1589-1599.
- CALLEJAS, C. AND OCHANDO, M.D. 2002. Phylogenetic relationships among Spanish *Barbus* species (Pisces, Cyprinidae) shown by RAPD markers. *Heredity* **89**, 36-43.
- CAMPOS, F. Y QUIROGA, R. 1988. Estudio para la ejecución del Plan Regional de conservación y fomento del cangrejo autóctono. Documento interno de la Dirección General del Medio Natural de la Junta de

Castilla y León. Valladolid.

- CARRAL, J.M., CELADA, J.D., GAUDIOSO, V.R., TEMIÑO, C. AND FERNÁNDEZ, R. 1988. Artificial incubation improvement of crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus* Dana) under low temperatures during embryonic development. *Freshwater Crayfish* **7**, 239-250.
- CARRAL, J.M., CELADA, J.D., GONZÁLEZ, J., SÁEZ-ROYEULA, M., GAUDIOSO, V.R., FERNÁNDEZ, R. AND LÓPEZ-BAISSON, C. 1993. Freshwater crayfish wild populations in Spain: current status and perspectives. *Freshwater Crayfish* **9**, 158-162.
- CELADA, J.D., GAUDIOSO, V.R., CARRAL, J.M., TEMIÑO, C. Y FERNÁNDEZ, R. 1984. Estado actual de las poblaciones y hábitats del cangrejo de río (*Austropotamobius pallipes* Lereboullet) en la provincia de León. *Anales de la Facultad de Veterinaria de León* **30**, 79-194.
- CELADA, J.D. Y GAUDIOSO, V.R. 1985. Localización y evaluación ecológica de las poblaciones y hábitats del cangrejo de río (*Austropotamobius pallipes* Lereboullet) en la provincia de León. *Boletín de la Estación Central de Ecología* **27**, 99-105.
- CELADA, J.D., CARRAL, J.M., TEMIÑO, C., GAUDIOSO, V.R. Y FERNÁNDEZ, R. 1986. Evolución de las poblaciones de cangrejo de río (*Austropotamobius pallipes* Lereboullet) y posibilidades de repoblación astacícola en la provincia de León. *Anales de la Facultad de Veterinaria de León* **32**, 145-167.
- CELADA, J.D., CARRAL, J.M., GAUDIOSO, V.R. Y FERNÁNDEZ, R. 1987. Morfometría externa en dos especies de cangrejos de río: *Austropotamobius pallipes* Lereboullet en ambiente natural y *Pacifastacus leniusculus* Dana en cría semi-controlada. *Anales de la Facultad de Veterinaria de León* **33**, 33-35.
- CELADA, J.D., CARRAL, J.M., GAUDIOSO, V.R., TEMIÑO, C. Y FERNÁNDEZ, R.

1989. Cangrejos de río y repoblaciones. Aspectos públicos y consideraciones metodológicas. En: JCCM y Diputación de Cuenca (eds.). I Jornadas de Acuicultura en Castilla-La Mancha. Cuenca, 145-154.
- CELADA, J.D., CARRAL, J.M., GONZÁLEZ, J. 1991. A study of the identification and chrology of the embryonic stages of the freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* Lereboullet 1858. *Crustaceana* **61** (3), 225-232.
- CERENIUS, L. AND SODERHALL, K. 1992. Crayfish diseases and crayfish as vectors for important diseases. *Finnish Fish. Res.* **14**, 125-133.
- CHAMBERS, P. A., MARK HANSON, J. AND BURKE, J. M. 1990. The impact of the crayfish *Orconectes virilis* on aquatic macrophytes. *Freshwater Biology* **24**, 81-91.
- CRANDALL, K.A. 1997. Genetic variation within and among crayfish species. *Freshwater Crayfish* **11**, 135-145.
- DE LA HOZ, J. 1997. Informe sobre la situación actual en Asturias de las poblaciones de cangrejo de río autóctono (*Austropotamobius pallipes*) y cangrejo americano de las marismas (*Procambarus clarkii*) con actualización de inventario de presencia. Documento interno de la Consejería de Agricultura del Principado de Asturias. Oviedo.
- DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. 1999. Plan de recuperación del cangrejo autóctono en Navarra. Documento interno del Servicio de Medio Ambiente del Gobierno de Navarra. Pamplona.
- DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. AND SODERHALL, K. 1993. *Procambarus clarkii* Girard as a vector for the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* Schikora. *Aquaculture and Fisheries Management* **24**, 761-765.
- DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. Y RUEDA, A. 1994. Nuevas esperanzas para el cangrejo de río autóctono. *Quercus* **97**, 8-12.

- DIÉGUEZ-URIBEONDO, J., RUEDA, A., CASTIEN, E. AND BASCONES, J. C. 1997a. A plan of restoration in Navarra for the native freshwater crayfish species of Spain, *Austropotamobius pallipes*. *Bull.Fr. Pêche Piscic.* **347**, 625-637.
- DIÉGUEZ-URIBEONDO, J., TEMIÑO, C. AND MÚZQUIZ, J. L. 1997b. The crayfish plague fungus (*Aphanomyces astaci*) in Spain. *Bull.Fr. Pêche Piscic.* **347**, 753-763.
- DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. Y TEMIÑO, C. 1998. La peste del cangrejo. *Trofeo pesca* **62**, 72-74.
- DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. Y MÚZQUIZ, J. L. 1999. Plan de recuperación del cangrejo autóctono, *Austropotamobius pallipes*, en Navarra. *Trofeo Pesca* **52**, 76-78.
- DOADRIO, I., PERDICES, A. AND MACHORDOM, A. 1996. Allozymic variation of the endangered killifish *Aphanius iberus* and its application to conservation. *Environmental Biology of Fishes* **45**, 259-271.
- FELSENSTEIN, J. 1988. Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Ann. Rev. Genet.* **22**, 521-565.
- FELSENSTEIN, J. 2001. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.6a2. Department of Genetics. University of Washington, Seattle.
- FEMINELLA, J. W. AND RESH, V. H. 1986. Effects of crayfish grazing on mosquito habitat at Coyote Hills Marsh. *Proceedings and papers of the fifty-fourth annual conference of the California Mosquito and vector control association, Inc.* 101-104.
- FERNÁNDEZ, P., SEGURA, D. Y OCHANDO, M.D. 2001. Taxonomía y diferenciación genética de *Ceratitis capitata* (Wiedeman, 1824) (Diptera, Tephritidae) y *Bactrocera oleae* (Gmelin, 1790) (Diptera, Tephritidae) mediante marcadores moleculares (RAPD-PCR). *Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. (Sec. Biol.)* **96**, 321-329.

- FETZNER, J. W. JR. 1996. Biochemical systematic and evolution of the crayfish genus *Orconectes* (Decapoda: Cambaridae). *Journal of Crustacean Biology* **116**, 111-141.
- FETZNER, J. W. JR. AND CRANDALL, K. A. 1999. Genetic variability within and among populations of the golden crayfish (*Orconectes luteus*): a comparison using amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) and mitochondrial 16s gene sequences. *Freshwater Crayfish* **12**, 396-412.
- FETZNER, J. W. JR., SHEEHAN, R.J. AND SEEB, L.W. 1997. Genetic implications of broodstock selection for crayfish aquaculture in the Midwestern United States. *Aquaculture* **154**, 39-55.
- FEVOLDEN, S. E. AND HESSEN, D. O. 1989. Morphological and genetic differences among recently founded populations of noble crayfish (*Astacus astacus*). *Hereditas* **110**, 149-158.
- GALINDO, J., MONZÓ, J. Y SANCHO, V. 2000. El declive del cangrejo de río en la Comunidad Valenciana. *Quercus* **173**, 12-17.
- GALINDO, J., NEBOT, Y., DELGADO, J.C. Y CHIROSA, M. 2003. Alarma tras la primera radiografía del cangrejo de río en Andalucía. *Quercus* **206**, 50-51.
- GIL, J.M. 1999. Situación, biología y conservación del cangrejo de río autóctono (*Austropotamobius pallipes*) en la provincia de Granada. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 211 p.
- GIL, J.M. Y ALBA-TERCEDOR, J. 1998. El cangrejo de río autóctono en la provincia de Granada. *Quercus* **144**, 14-15.
- GIL, J.M. Y ALBA-TERCEDOR, J. 2000. Mejora la situación del cangrejo de río en Granada. *Quercus* **173**, 17.
- GILPIN, M. 1991. The genetic effective size of a metapopulation. *Biol. J. Linn. Soc.* **42**, 165-175.

- GÓMEZ DE DIEGO, M. S. 1991. Conservación y fomento del cangrejo autóctono de río en la provincia de Ávila. Documento interno de la Diputación de Ávila. Ávila.
- GONZÁLEZ, N., POLLO, C.J., VELASCO, J.C. Y LOSA, J. 1989. Inventario astacícola de la provincia de Salamanca. Evolución y distribución de las poblaciones de cangrejo de río autóctono (*Austropotamobius pallipes*) y de cangrejo rojo americano (*Procambarus clarkii*). Documento interno del Servicio Territorial de Medio Ambiente de Salamanca. Salamanca.
- GOUIN, N., GRANDJEAN, F. AND SOUTY-GROSSET, C. 2000. Characterization of microsatellite loci in the endangered freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* (Astacidae) and their potential use in other decapods. *Molecular Ecology* **9**, 629-644.
- GOUIN, N., GRANDJEAN, F., BOUCHON, D., REYNOLDS, J. D. AND SOUTY-GROSSET, C. 2001. Population genetic structure of the endangered freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes*, assessed using RAPD markers. *Heredity* **86**, 1-8.
- GRANDJEAN, F. AND SOUTY-GROSSET, C. 1996. Isolation and characterization of mitochondrial DNA from the endangered white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes pallipes*, Lereboullet, 1958. *Bull.Fr. Pêche Piscic.* **343**, 175-182.
- GRANDJEAN, F., SOUTY-GROSSET, C. AND HOLDICH, D. M. 1997a. Mitochondrial DNA variation in four British populations of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes*: implications for management. *Aquac.Living Resour.* **10**, 121-126.
- GRANDJEAN, F., SOUTY-GROSSET, C., RAIMOND, R. AND HOLDICH, D. M. 1997b. Geographical variation of mitochondrial DNA between populations of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes*. *Freshwater Biology* **37**, 493-501.

- GRANDJEAN, F., ROMAIN, D., AVILA-ZARZA, C., BRAMARD, M., SOUTY-GROSSET, C., AND MOCQUARD, J.P. 1997c. Morphometry, sexual dimorphism at size maturity of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet) from a wild French population at Deux-Sevres (Decapoda, Astacidae). *Crustaceana* **70** (1), 31-44.
- GRANDJEAN, F., ROMAIN, D., SOUTY-GROSSET, C., AND MOCQUARD, J.P. 1997d. Size at sexual maturity and morphometric variability in three populations of *Austropotamobius pallipes pallipes* (Lereboullet, 1858) according to a restocking strategy. *Crustaceana* **70** (4), 454-468.
- GRANDJEAN, F., GOUIN, N., FRELON, M. AND SOUTY-GROSSET, C. 1998. Genetic and morphological systematic studies on the crayfish *Austropotamobius pallipes* (Decapoda: Astacidae). *Journal of Crustacean Biology* **18** (3), 549-555.
- GRANDJEAN, F. AND SOUTY-GROSSET, C. 2000. Mitochondrial DNA variation and populations genetic structure of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes pallipes*. *Conservation Genetics* **1**, 309-319.
- GRANDJEAN, F., HARRIS, D.J., SOUTY-GROSSET, C. AND CRANDALL, K.A. 2000. Systematics of the European endangered crayfish species *Austropotamobius pallipes* (Decapoda: Astacidae). *Journal of Crustacean Biology* **20** (3), 522-529.
- GRANDJEAN, F., GOUIN, N., SOUTY-GROSSET, C. AND DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. 2001. Drastic bottlenecks in the endangered crayfish species *Austropotamobius pallipes* in Spain and implications for its colonization history. *Heredity* **86**, 431-438.
- GRANDJEAN, F., FRELON-RAIMOND, M. AND SOUTY-GROSSET, C. 2002. Compilation of molecular data for the phylogeny of the genus *Austropotamobius*: one species of several?. *Bull.Fr.Pêche Piscic.* **367**, 671-680.

- HABSBURGO-LORENA, A.S. 1979. Present situation of exotic species of crayfish introduced to Spanish continental waters. *Freshwater Crayfish* **4**, 175-184.
- HABSBURGO-LORENA, A.S. 1986. The status of the *Procambarus clarkii* populations in Spain. *Freshwater Crayfish* **6**, 131-133.
- HARRIS, H. 1966. Enzyme polymorphisms in man. *Proc. R. Soc. B. Biol. Sci.* **164**, 298-310.
- HEDGECOCK, D., SHLESER, R.A. AND NELSON, K. 1976. Applications of biochemical genetic to aquaculture. *J. Fish. Res. Board Can.* **33**, 1108-1119.
- HEDGECOCK, D., TRACEY, M.L. AND NELSON, K. 1980. Genetics. In: The Biology of Crustacea (eds. Bliss D.E.). New York Academic Press.
- HEWITT, G. M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* **58**, 247-276.
- HOLDICH, D. M. 1987. The dangers of introducing alien animals with particular reference to crayfish. *Freshwater Crayfish* **7**, 15-30.
- HOLDICH, D. M. 1988.(eds.). Biology of freshwater crayfish. Blackwell Science. London. 498 p.
- HOLDICH, D. M. 2002a. Distribution of crayfish in Europe and some adjoining countries. *Bull.Fr.Pêche Piscic.* **367**, 611-650.
- HOLDICH, D. M. 2002b. (eds.). Biology of freshwater crayfish. Blackwell Science. London. 702 p.
- HORWITZ, P., ADAMS, M. AND BAVERSTOCK, P. 1990. Electrophoretic contributions to the systematics of the freshwater crayfish genus *Engaeus* Erichson (Decapoda: Parastacidae). *Invertebrate Taxonomy* **4**, 615-641.

- HUANG, T., CERENIUS, L. AND SODERHALL, K. 1994. Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture* **126**, 1-10.
- HUBBY, J.L. AND LEWONTIN, R.C. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* **54**, 577-594.
- HUNTER, R.L. AND MARKET, C.L. 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* **125**, 1294-1295.
- IGLESIAS, A., CAMPOS, L., VIANA, J. L., FERNÁNDEZ, A. Y SÁNCHEZ, L. 1998. Estudio de la composición corporal del cangrejo de río *Austropotamobius pallipes*. *Arch. Zootec.* **47**, 473-477.
- KARAMAN, M.S. 1963. Studie der Astacidae (Crustacea, Decapoda). *Hidrobiología* **22**, 111-132.
- KOPPELMAN, J.B. AND FIGG, D.E. 1995. Genetic estimates of variability and relatedness for conservation of an Ozark cave crayfish species complex. *Conservation Biology* **9**, 1288-1294.
- LANDE, R. 1995. Mutation and conservation. *Conservation Biology* **9**, 782-791.
- LAURENT, P.J. 1988. *Austropotamobius pallipes* and *A. torrentium*, with observations on their interaction with other species in Europe. In: Holdich, D.M. and Lowery, R.S. (eds.). Freshwater crayfish: biology, management and exploitation. Croom-Helm, London, 341-364.
- LEÓN-QUINTO, T., SORIA, B. Y JONES, J. 2003. Nuevas estrategias de conservación: el primer banco celular somático de fauna española amenazada. *Quercus*. **214**, 26-31.
- LEZÁRRAGA, M. 1995. Informe sobre los cangrejos en la provincia de Zamora. Documento interno del Servicio Territorial de Medio Ambiente de

Zamora. Zamora.

LEWONTIN, R.C. 1972. The apportionment of human diversity. *Evol. Biol.* **6**, 381-398.

LEWONTIN, R.C. AND HUBBY, J.L. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* **54**, 595-609.

LIN, H., DOWNIE, D.A., WALKER, M.A., GRANETT, J. AND ENGLISH-LOEB, G. 1999. Genetic structure in native populations of grape phylloxera (Homoptera: Phylloxeridae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **92**, 376-381.

LODGE, D. M. 1993. Biological invasions: lessons for ecology. *TREE* **8**, 133-137.

LODGE, D. M. AND LORMAN, J. G. 1987. Reductions in submersed macrophyte biomass and species richness by the crayfish *Orconectes rusticus*. *Can. Jour.Aquat.Sci.* **44**, 591-597.

LÓPEZ, M.A. Y GARRIDO, G. 1994. Revisión y ampliación del inventario de cangrejos en aguas continentales de Soria. Documento interno del Servicio Territorial de Medio Ambiente de Soria. Soria.

LÖRTSCHER, M., STUCKI, T. P., CLALUNA, M. AND SCHOLL, A. 1997. Phylogeographic structure of *Austropotamobius pallipes* populations in Switzerland. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* **347**, 649-661.

LÖRTSCHER, M., CLALUNA, M. AND SCHOLL, A. 1998. Genetic population structure of *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet 1858) (Decapoda: Astacidae) in Switzerland, based on allozyme data. *Aquatic Sciences* **60**, 118-129.

LOZANO, J. Y MARTÍN, J. 1988. Trabajos de investigación sobre acuicultura y gestión en la provincia de Cuenca. En: JCCM y Diputación de Cuenca (eds.). I Jornadas de Acuicultura en Castilla-La Mancha. Cuenca, Pp.

155-197.

LYNCH, M. AND MILLIGAN, B. G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* **3**, 91-99.

LLAMAZARES, T.E. Y CELADA, J.D. 1990. El cangrejo de río en la provincia de León. Inventario 1989. Documento interno del Servicio Territorial de Medio Ambiente de León. León.

LLORENS, T.M., AYRE, D.J. AND WHELAN, R.J. 2004. Evidence for ancient genetic subdivision among recently fragmented populations of the endangered shrub *Grevillea caleyi* (Proteaceae). *Heredity*, 1-8.

MACARANAS, J. M., MATEHER, P. B., HOEBEN, P. AND CAPRA, M. F. 1995. Assesment of genetic variation in wild populations of the redclaw crayfish (*Cherax quetricarinatus*, von Martens 1868) by means of allozyme and RAPD-PCR markers. *Marine Freshwater Res.* **46**, 1217-1228.

MADOZ, P. 1850-1853. Diccionario goeográfico-estadístico-histórico de España y sus posesiones de Ultramar. Madrid.

MANTEL, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* **27**, 209-220.

MARTÍNEZ, J.G. 2002. La evolución y la conservación de la biodiversidad. En: M. Soler, eds.: Evolución. La base de la biología. Proyecto Sur de Ediciones. Pp. 407-416.

MATEUS, A. 1934. O Astacus de S. Martinho de Angueira (Trás-os-Montes). *Trab. Assoc. Filosofia Natural.* **1 (1)**, 33-44.

MAYURAMA, T. 1970. Effective number of alleles in a subdivided population. *Theoret. Popul. Biol.* **1**, 273-306.

MAYURAMA, T. 1972. Distribution of gene frequencies in a geographically structured finite population. I. Distribution of neutral genes and of

- genes with a small effect. *Ann. Hum. Genet.* **35**, 411-423.
- MENDOZA, F. Y UNZU, F.J. 1997. Informe sobre las poblaciones de cangrejo autóctono en la Comunidad Autónoma de La Rioja. Documento interno del Servicio de Protección de Fauna Silvestre de La Rioja. Logroño.
- MOMOT, W. T. 1995. Redifining the role of crayfish in aquatic ecosystems. *Reviews in Fisheries Science* **3**, 33-63.
- MOMOT, W. T., GOWING, H. AND JONES, P. D. 1978. The dynamics of crayfish and their role in ecosystems. *American Midland Naturalist* **99**, 10-35.
- MONDEDEU, I. Y ORTUÑO, S. 1989. Estudio sobre la conservación y el fomento del cangrejo autóctono. Documento interno del Servicio Territorial de Medio Ambiente de Segovia. Segovia.
- MORI, M., SALDIVIO, S. AND GRANDONI, G. 2001. Morphological variation in *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) from Liguria, NW Italy: a multivariate study. Comunicación presentada al IAA European Meeting: Knowledge-based management of european native crayfishes. Poitiers.
- MORITZ, C. 1994. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation; a critical review. *Molecular Ecology* **3**, 401-411.
- MULLIS, K.B., FALOONA, F.A., SCHERF, S., SAIKI, R., HORN, G. AND ERLICH H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*. The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* **51**, 263-273.
- NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* **106**, 283-292.
- NEI, M., MAYURAMA, T. AND CHAKRABORTY, R. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* **29**, 1-10.
- NEMETH, S. T. AND TRACEY, M. L. 1979. Allozyme variability and relatedness

- in six crayfish species. *The Journal of Heredity* **70**, 37-43.
- NEVO, E.T., BELLES, A. AND BEN SHLOMO, R. 1984. The evolutionary significance of genetic diversity: ecological, demographic and life historic correlates. In: Mani, G.S. (ed.) *Evolutionary dynamics of genetic diversity*, Lecture notes in biomathematics. Springer, Berlin, 14-213.
- OLSEN, T. M. AND LODGE, D. M. 1991. Mechanisms of impact of an introduced crayfish (*Orconectes rusticus*) on littoral congeners, snails and macrophytes. *Canadian J.Fish. Aquat. Sci.* **48**, 1853-1861.
- PARDO, L. 1942. Astacicultura elemental. Ministerio de Agricultura. Madrid. 174 p.
- PARDO, L. 1950-1951. Apuntes para la historia de la pesca continental española. Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias. Madrid. 342+448 p. (2 vols.).
- PARDO, L. 1953. Apuntes para la historia del Servicio Piscícola. Tomo I: Parte General. Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias. Madrid. 346 p.
- PÉREZ, J.R., CARRAL, J.M., CELADA, J.D., SÁEZ-ROYUELA, M., MUÑOZ, C. AND ANTOLÍN, J.I. 1999. The possibilities for artificial incubation of white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes* Lereboullet) eggs. Comparison between maternal and artificial incubation. *Aquaculture* **170**, 29-35.
- PÉREZ-CECILIA, P., CASTRO, E. Y GONZÁLEZ, J.C. 1997. Inventario de cangrejo autóctono en la provincia de Palencia. Documento interno del Servicio Territorial de Medio Ambiente de Palencia. Palencia.
- PLATT, T. AND SPITZE, K. 2000. Genetic variation in a subtropical population of *Daphnia*. *Hydrobiologia* **435**, 191-196.
- RABENI, C.F., GOSSET, M. AND McCLENDON, D.D. 1995. Contribution of

- crayfish to benthic invertebrate production and trophic ecology of an Ozark stream. *Freshwater Crayfish* **10**, 163-173.
- REY, A. 1994. El cranc de riu a Catalunya. Documento interno de la Direcció de Agricultura, Ramaderia i Pesca. Girona.
- REYNOLDS, J.R. 2002. Growth and reproduction. En: D.M. Holdich, eds.: *Biology of freshwater crayfish*. Blackwell Science. United Kingdom. Pp. 152-191.
- ROHLF, J. 1990. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. NTSYS-pc. Dept. Ecol. Evol. New York.
- ROYO, F., DIÉGUEZ-URIBEONDO, J., SOUTY-GROSSET, C. AND GRANDJEAN, F. 2003. Founder effect within Spanish crayfish stocks as a result of two translocation events. The endangered native crayfish *Austropotamobius pallipes*. Bioindicator and heritage species. IAA European meeting. Kilkenny, Ireland. 22-24 June 2003.
- SAMBROOK, J., FRISCH, E.F. AND MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SANTUCCI, F., IACONELLI, M., ANDREANI, P., CIANCHI, R., NASCETTI, G. AND BULLINI, L. 1997. Allozyme diversity of european freshwater crayfish of the genus *Austropotamobius*. *Bull.Fr. Pêche Piscic.* **347**, 663-676.
- SCHNEIDER, S., ROESSLI, D. AND EXCOFFIER, L. 2000. Arlequin: A software for population genetics data analysis. Version 2.000. Genetics and Biometry Lab, Department of Anthropology and Ecology. University of Geneva, Switzerland.
- SCHULZ, R. 2000. Status of the noble crayfish *Astacus astacus* (L.) in Germany: monitoring protocol and the use of RAPD markers to asses the genetic structure of populations. *Bull.Fr. Pêche Piscic.* **356**, 123-138.
- SKURDAL, J. AND TAUGBØL, T. 1992. Crayfish management in Norway. *Finnish*

- Fisheries Research* **14**, 33-37.
- SNEATH, P.H.A. AND SOKAL, R.R. 1973. *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco.
- SOKAL, R.R. AND MICHENER, C.D. 1958. A statistical method for evaluation systematic relationships. *Univ. Kansas Sci. Bull.* **38**, 1409-1438.
- SOUTY-GROSSET, C., GRANDJEAN, F. AND GOUIN, N. 1999. Molecular genetic contributions to conservation biology of the european native crayfish *Austropotamobius pallipes*. *Freshwater Crayfish* **12**, 371-386.
- SOUTY-GROSSET, C., GRANDJEAN, F., RAIMOND, R., FRELON, M., DEBENEST, C. AND BRAMARD, M. 1997. Conservation genetics of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes*: the usefulness of the mitochondrial DNA marker. *Bull.Fr. Pêche Piscic.* **347**, 677-692.
- STEIN, R.A. 1976. Sexual dimorphism in crayfish chelae: funtional significance linked to reproductive activities. *Canadian Journal Zoology* **54**, 220-227.
- SUTHERLAND, W.J. 2000. The conservation handbook. Research, management and policy. Blackwell Science Ltd. Cambridge.
- TEMIÑO, C. Y SÁEZ-ROYUELA, M. 1998. Resumen de los inventarios de cangrejo autóctono *Austropotamobius pallipes* realizados en la provincia de Burgos entre 1984 y 1997. Documento interno del Servicio Territorial de Medio Ambiente de Burgos. Burgos.
- TORRE, M. Y RODRÍGUEZ, P. 1964. El cangrejo de río en España. Servicio Nacional de Pesca Fluvial y Caza. Ministerio de Agricultura. Madrid. 107 p.
- TRACEY, M. L., NELSON, K., HEDGECOCK, D., SHLESER, R. A. AND PRESSCIK, M. L. 1975. Biochemical genetics of lobsters: genetic variation and the structure of americam lobster (*Homarus americanus*) populations. *Journal Fishery Research Board Canadian* **32**, 2091-2101.

- VOS, P., HOGERS, R. AND BLEEKER, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**, 4407-4414.
- WEIR, B.S. AND COCKERHAM, C.C. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of populations structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- WELSH, J. AND MCCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nuc. Acids Res.* **18**, 7213-7218.
- WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A. AND TINGEY, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**, 6531-6535.
- WILLIAMSON, M. 1996. Biological invasions. Population and community series 15. Chapman and Hall. U.K. 250 p.
- WRIGHT, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* **16**, 97-159.
- WRIGHT, S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* **15**, 323-354.
- ZARAZAGA, M. 1993. Estudios genéticos de poblaciones astacícolas españolas. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. 271 p.

Anexos

ANEXOS

ANEXO 1. Abreviaturas generales

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNmt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
dNTPs	Desoxinucleótidos tri-fosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
M	Molar
mM	Mili molar
μM	Micro molar
pb	Pares de bases
PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RAPD	ADN polimórfico amplificado al azar
RFLP	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
Tris	Trihidroximetilaminometano; 2-amino-2-hidroxi-1,3-propanodiol

ANEXO 2. Abreviaturas de las poblaciones analizadas de
Austropotamobius pallipes

COS	Coscile, Región de Calabria (Italia)
CUE	Arroyo Cuende, Cuenca
GIR	Arroyo Santa Margarida, Girona
GRA	Arroyo Ermitas, Granada
GUZ	Arroyo Guztar, Burgos
LEO	Laguna Valsemana, León
MAD	Manantial Madalena, Burgos
NAV	Río Ega, Navarra
POZ	Arroyo Pozuelo, Cuenca
PVS	Río Nervión, Alava
RIL	Astacifactoría de Rillo de Gallo, Guadalajara
VIL	Río Guadazaón, Cuenca

ANEXO 3. Abreviaturas de las medidas morfométricas

LCF	Longitud de cefalotórax (mm)
LT	Longitud total (mm)
ACF	Anchura de cefalotórax (mm)
Lros	Longitud del rostro (mm)
ABASROS	Anchura de la base del rostro (mm)
ILPINZA	Longitud máxima de la pinza izquierda (mm)
DLPINZA	Longitud máxima de la pinza derecha (mm)
IAPINZA	Anchura máxima de la pinza izquierda (mm)
DAPINZA	Anchura máxima de la pinza derecha (mm)
IESP3MAX	Número de espinas del tercer maxilípodo izquierdo
DESP3MAX	Número de espinas del tercer maxilípodo derecho
IESPCER	Número de espinas cervicales del lado izquierdo
DESPCER	Número de espinas cervicales del lado derecho
SEXO	Sexo (macho: 1, hembra: 0)
PESO	Peso (g)
ML2P	Morfología del lóbulo del segundo pleópodo (simétrico o asimétrico)

ANEXO 4. Matriz de correlaciones de las once poblaciones de *A. pallipes* analizadas

EJE	SMS*	% de variación	% de variación acumulado
1	0,0142	35,18	35,18
2	0,0086	21,25	56,43
3	0,0076	18,95	75,38
4	0,0037	9,25	84,63
5	0,0034	8,52	93,16
6	0,0023	5,76	98,92
7	0,0015	3,76	>100
8	0,0013	3,29	>100
9	0,0005	1,45	>100
10	0,0000	0,11	>100
11	0,0000	0,01	>100

Matriz de correlaciones de las once poblaciones de *A. pallipes* analizadas.

*: suma de cuadrados de las saturaciones

ANEXO 5. Matriz de correlaciones de las doce poblaciones de *A. pallipes* analizadas

EJE	SMS*	% de variación	% de variación acumulado
1	0.3436	78.46	78.46
2	0.0685	15.66	94.12
3	0.0556	12.71	>100
4	0.0513	11.73	>100
5	0.0195	4.45	>100
6	0.0149	3.42	>100
7	0.0094	2.15	>100
8	0.0067	1.54	>100
9	0.0018	0.41	>100
10	0.0001	0.03	>100
11	0.0001	0.03	>100

Matriz de correlaciones de las doce poblaciones de *A. pallipes* analizadas.

*: suma de cuadrados de las saturaciones

ANEXO 6. Caracterización morfométrica de cada una de las poblaciones españolas de *Austropotamobius pallipes* analizadas

Río: Arroyo Cuende

Localidad: Huerta de la Obispalía (Cuenca)

Código: CUE

Fecha de muestreo: 07/09/00

Nº	SEXO	PESO (g)	LCF (cm)	LT (cm)	ACF (cm)	LROS (cm)	ABASROS (cm)	AAPROS (cm)	LAP (cm)	IESP3MAX	DESP 3MAX	ILPINZA (cm)	IAPINZA (cm)	DLPINZA (cm)	DAPINZA (cm)	IESP CER	DESP CER	LOB. PLEOP.
1	0	12,2	3,63	7,71	1,94	1,68	1,2	0,6	0,15	5	5	2,55	0,86	1,4	0,41	1	1	asimétrico
2	1	7,55	3,03	6,33	1,66	1,4	1,05	0,55	0,12	5	3	1,52	0,53	1,8	0,6	2	2	
3	1	5,79	2,87	5,91	1,49	1,23	1,02	0,5	0,12	3	4	1,06	0,32	1,53	0,64	2	2	
4	1	6,53	3,1	6,39	1,6	1,3	1,07	0,52	0,1	5	5	-	-	1,4	0,48	3	3	
5	0	26,02	4,44	8,8	2,34	2,08	1,52	0,8	0,18	7	6	3,83	1,4	3,98	1,56	2	2	asimétrico
6	0	5,61	2,86	5,61	1,46	1,23	1	0,5	0,14	2	2	1,43	0,5	1,51	0,55	1	1	asimétrico
7	1	5,42	2,71	5,77	1,32	1,06	0,96	0,46	0,14	4	5	1,45	0,55	1,48	0,63	2	1	
8	0	7,9	3,13	6,2	1,67	1,41	0,97	0,5	0,14	1	2	2,04	0,72	1,95	0,65	1	1	asimétrico
9	0	15,92	4,03	8,15	2,14	1,88	1,27	0,7	0,15	6	5	-	-	2,98	1,07	1	1	asimétrico
10	0	23,52	4,2	8,41	2,25	1,99	1,27	0,67	0,14	5	5	3,85	1,42	3,96	1,55	1	1	asimétrico
11	0	14,95	3,76	7,78	2,02	1,76	1,15	0,65	0,15	5	5	2,66	1,05	2,66	1,04	3	3	asimétrico
12	0	7,65	2,97	6,3	1,7	1,44	0,89	0,55	0,05	4	4	1,4	0,4	2,12	0,8	3	3	asimétrico
13	1	5,6	2,84	5,85	1,46	1,2	1,07	0,51	0,12	5	4	1,46	0,56	1,52	0,6	2	2	
14	1	5,64	2,87	0,74	1,4	1,14	0,9	0,5	0,13	7	4	1,38	0,42	1,68	0,57	2	2	
15	1	6,46	3	6	1,52	1,28	0,92	0,51	0,11	2	2	1,55	0,6	1,55	0,54	1	1	
16	0	10,3	3,4	6,76	1,79	1,53	1,15	0,59	0,11	6	6	2,27	0,89	2,28	0,88	2	2	asimétrico
17	0	6,85	3,06	6,27	1,56	1,3	1,06	0,5	0,13	3	2	1,74	0,61	1,83	0,68	1	1	asimétrico
18	1	10,66	3,42	7,2	1,77	1,51	1,12	0,61	0,12	3	3	1,95	0,65	1,76	0,6	3	3	
19	0	4,66	2,71	5,5	1,33	1,07	1	0,46	0,08	3	4	1,58	0,6	1,42	0,5	2	2	asimétrico
20	0	25,58	4,28	8,3	2,3	2,04	1,34	0,7	0,12	7	4	4,37	1,6	4,33	1,53	1	1	asimétrico
21	0	12,38	3,56	7,2	1,9	1,61	1,15	0,6	0,16	5	5	2,53	1	2,56	1,07	1	1	asimétrico
22	0	11,56	3,51	7,22	1,9	1,62	1,05	0,63	0,14	4	4	2,3	0,8	2,38	0,8	1	1	asimétrico
23	0	23,11	4,02	7,9	2,23	1,97	1,13	0,65	0,13	4	4	3,8	1,52	3,77	1,55	1	1	asimétrico
24	1	9,04	3,39	6,77	1,7	1,47	1,12	0,55	0,12	3	4	1,67	0,63	2	0,75	2	2	
25	0	7,18	3,15	6,32	1,6	1,34	1,14	0,53	0,11	4	4	1,8	0,62	1,84	0,67	1	1	asimétrico
26	0	24,71	4,4	8,24	2,41	2,15	1,34	0,73	0,14	6	5	2,08	0,7	3,43	1,55	1	1	asimétrico
27	0	11,44	3,52	7,15	1,9	1,64	1,32	0,61	0,15	4	2	2,25	0,89	2,4	1	1	1	asimétrico
28	1	8,35	3,23	6,43	1,7	1,39	1,08	0,61	0,14	4	4	1,43	0,56	1,46	0,52	2	2	
29	1	7,65	3,07	6,74	1,71	1,45	1,07	0,6	0,14	3	3	1,74	0,6	1,81	0,66	2	2	
30	1	7,26	3,12	6,5	1,61	1,35	1,05	0,55	0,15	2	2	1,75	0,63	-	-	3	3	
31	0	12,43	3,65	7,45	1,97	1,71	1,04	0,64	0,12	4	3	2,4	0,76	2,43	0,83	4	4	asimétrico
32	1	10,11	3,4	7,17	1,74	1,48	1,1	0,56	0,11	3	5	2,06	0,87	2,08	0,89	2	2	
33	0	7,36	3,13	6,46	1,62	1,36	1	0,51	0,13	4	2	2,07	0,71	-	-	2	2	asimétrico
34	0	22,28	4,38	8,56	2,3	2,1	1,38	0,7	0,17	4	3	3,51	1,43	3,22	1,3	2	1	asimétrico
35	1	11,86	3,67	7,74	1,92	1,66	1,22	0,65	0,15	3	5	1,92	0,7	1,96	0,7	3	2	
36	1	5,85	2,87	5,96	1,5	1,24	1	0,5	0,11	4	3	1,55	0,57	1	0,4	1	1	
37	0	6,23	2,87	5,52	1,52	1,26	0,97	0,47	0,05	4	4	1,75	0,7	1,79	0,72	1	1	asimétrico
38	0	5,4	2,76	5,46	1,45	1,19	0,95	0,49	0,11	4	4	1,76	0,67	1,8	0,7	1	1	asimétrico
39	1	6,9	3,08	6,65	1,58	1,32	1,07	0,52	0,08	3	3	1,65	0,6	1,54	0,53	1	1	
40	0	7,96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Caracterización morfométrica de *A. pallipes* de la población de A. Cuende (CUE). En la parte superior se indica el código, localidad a la que pertenece y fecha de muestreo de la población.

Río: Arroyo Santa Margarida

Localidad: Olot (Gerona)

Código: GIR

Fecha de muestreo: 19/09/00

Nº	SEXO	PESO (g)	LCF (cm)	LT (cm)	ACF (cm)	LROS (cm)	ABASROS (cm)	AAPROS (cm)	LAP (cm)	IESP3MAX	DESP 3MAX	ILPINZA (cm)	IAPINZA (cm)	DLPINZA (cm)	DAPINZA (cm)	IESP CER	DESP CER	LOB. PLEOP.
1	0	16,06	3,86	7,35	2,12	1,86	1,14	0,67	0,12	7	7	2,36	0,81	2,18	0,77	2	2	asimétrico
2	1	7,01	3,24	6,57	1,6	1,34	1,13	0,6	0,13	3	4	-	-	1,25	0,4	2	2	
3	1	5,23	2,81	5,62	1,46	1,2	0,93	0,52	0,13	5	3	1,24	0,57	0,76	0,26	2	2	
4	0	5,91	2,93	5,95	1,51	1,28	1,02	0,53	0,1	6	6	1,83	0,6	1,9	0,65	1	1	asimétrico
5	1	12,18	3,73	7,66	2	1,74	1,21	0,71	0,13	7	8	-	-	-	0,65	2	2	
6	1	7,94	3	6,07	1,61	1,35	1,06	0,6	0,07	7	6	1,8	0,75	1,81	0,77	2	1	
7	1	2,08	2,1	4,3	1,02	0,76	0,73	0,37	0,08	3	2	-	0,4	-	-	2	2	
8	1	7,13	3,12	6,22	1,64	1,38	1,07	0,58	0,12	6	6	1,03	0,32	1,92	0,72	3	3	
9	0	12,49	3,69	7,2	1,87	1,61	1,18	0,62	0,15	7	5	2,95	1,2	1,25	0,4	1	1	asimétrico
10	1	14,08	3,72	7,8	2,05	1,79	1,11	0,7	0,13	5	5	2,65	1,1	2,67	1,12	1	2	
11	0	6,14	2,85	6	1,52	1,26	1,05	0,5	0,11	6	5	2	0,82	1,24	0,37	1	1	asimétrico
12	0	8,86	3,35	6,77	1,72	1,46	1,14	0,58	0,14	5	4	-	-	2,2	0,94	2	2	asimétrico
13	1	9,52	3,2	6,72	1,86	1,42	1	0,6	0,1	5	1	2,01	0,88	1,54	0,65	3	3	
14	1	8,43	3,36	6,97	1,81	1,55	1,17	0,65	0,11	6	7	-	-	1,62	0,6	3	2	
15	0	2,28	2,05	4	1,02	0,96	0,7	0,4	0,08	3	5	1,21	0,42	1,22	0,45	1	1	asimétrico
16	1	3,23	2,27	4,9	1,2	0,94	0,77	0,41	0,12	4	6	1,16	0,47	-	-	1	3	
17	0	3,04	2,23	4,46	1,11	0,85	0,82	0,8	0,07	4	2	1,41	0,57	1,41	0,57	1	1	asimétrico
18	0	9,52	3,51	7	1,87	1,73	1,13	0,63	0,12	6	7	1	0,36	-	-	2	2	asimétrico
19	0	26,29	4,32	8,55	2,4	2,14	1,27	0,74	0,12	6	4	4,07	1,68	4,02	1,65	1	2	asimétrico
20	1	6,56	2,9	6,17	1,5	1,24	1,07	0,54	0,12	5	5	1,8	0,74	1,65	0,56	1	1	
21	0	9,78	3,76	6,6	1,7	1,32	0,97	0,56	0,12	5	5	2,58	1,07	2,2	0,82	3	2	asimétrico
22	1	11,39	3,62	7,55	2,05	1,43	1,14	0,66	0,13	5	5	1,85	0,64	-	-	3	3	
23	0	6,66	2,96	6,02	1,47	1,21	1,12	0,51	0,11	6	5	2,16	0,89	2	0,8	2	3	asimétrico
24	0	6,41	2,97	5,78	1,51	1,25	0,96	0,51	0,13	6	6	1,76	0,77	-	-	1	1	asimétrico
25	1	5	3,82	5,84	1,42	1,16	0,97	0,5	0,1	3	3	-	-	1,67	0,61	2	2	
26	1	5,15	2,82	5,74	1,43	1,17	0,97	0,54	0,07	7	6	1,1	0,39	-	-	2	3	
27	1	7,08	3,3	6,34	1,65	1,39	1	0,62	0,11	6	5	-	-	-	-	2	2	
28	0	15,53	3,6	7,27	1,95	1,69	1,05	0,57	0,15	5	6	3,42	1,42	3,07	1,23	1	1	asimétrico
29	1	3,84	2,43	4,78	1,25	0,99	0,9	0,43	0,08	5	4	1,37	0,62	1,44	0,6	2	1	
30	1	19,72	4,19	8,57	2,32	2,06	1,23	0,77	0,14	7	6	3,03	1,2	2,92	1,2	3	3	
31	1	8,31	3,27	6,46	1,67	1,41	1,16	0,62	0,12	5	4	1,95	0,8	1,96	0,8	2	1	
32	0	16,58	3,68	7	1,92	1,66	1,06	0,62	0,15	5	9	3,44	1,47	3,22	1,46	2	2	asimétrico
33	0	21,59	4,08	7,8	2,13	1,87	1,11	0,72	0,14	5	6	3,7	1,53	3,55	1,56	2	2	asimétrico
34	0	5,87	2,92	5,78	1,47	1,21	1,06	0,51	0,08	3	3	1,89	0,7	1,2	0,4	2	1	asimétrico
35	0	13	3,57	6,98	1,87	1,61	1,21	0,6	0,1	5	7	2,73	1,17	2,7	1,15	1	1	asimétrico
36	1	7,55	3,22	6,45	1,71	1,45	1,03	0,55	0,12	3	3	1,52	0,53	1,08	0,39	2	4	
37	1	11,33	3,5	7,24	1,84	1,58	1,12	0,65	0,1	5	6	1,7	0,6	2,12	0,87	1	1	
38	1	2,83	2,2	4,23	1,12	0,86	0,82	0,42	0,09	6	5	1,32	0,55	1,32	0,53	1	1	
39	1	8,48	3,1	6,45	1,7	1,44	0,93	0,62	0,12	6	6	1,92	0,73	1,65	0,58	3	3	
40	0	24,48	3,93	7,8	2,19	1,93	1,15	0,7	-	6	7	3,83	1,65	3,83	0,65	2	2	asimétrico

Caracterización morfométrica de *A. pallipes* de la población de P.N.V. Garrotxa (GIR). En la parte superior se indica el código, localidad a la que pertenece y fecha de muestreo de la población.

Río: Arroyo de las Ermitas

Localidad: Albuñuelas (Granada)

Código: GRA

Fecha: 05/08/99

Nº	SEXO	PESO (g)	LCF (cm)	LT (cm)	ACF (cm)	LROS (cm)	ABASROS (cm)	AAPROS (cm)	LAP (cm)	IESP3MAX	DESP 3MAX	ILPINZA (cm)	IAPINZA (cm)	DLPINZA (cm)	DAPINZA (cm)	IESP CER	DESP CER	LOB. PLEOP.
1	1	9,82	3,69	6,57	1,82	0,94	0,57	0,09	0,08	4	6	1,92	0,77	1,99	0,8	3	3	
2	1	23,89	4,3	9,27	2,55	1,39	0,78	0,2	0,21	8	9	2,86	1,42	2,88	1,4	4	4	
3	0	17,3	3,79	7,87	2,17	1,21	0,66	0,16	0,14	7	9	2,73	1,31	2,51	1,12	3	3	asimétrico
4	1	8,91	3,06	6,7	1,71	1,02	0,58	0,14	0,15	6	7	1,83	0,82	1,86	0,91	3	3	asimétrico
5	0	10,98	3,32	6,98	1,83	1,13	0,53	0,11	0,11	6	7	2,42	1,09	2,44	1,1	2	2	asimétrico
6	1	15	3,97	8,71	2,11	1,34	0,72	0,15	0,1	9	8	falta	falta	falta	falta	2	3	
7	1	3,78	2,34	4,85	1,27	0,81	0,48	0,07	0,1	7	5	1,27	0,51	1,25	0,55	2	1	
8	0	19,28	4,12	8,72	2,35	1,18	0,72	0,14	0,16	6	4	2,76	0,9	2,53	0,87	2	1	asimétrico
9	0	3,76	2,37	4,88	1,24	0,71	0,42	0,11	0,13	6	6	1,5	0,66	0,89	0,3	2	3	asimétrico
10	0	2,91	2,15	4,52	1,13	0,93	0,38	0,99	0,18	6	5	1,28	0,55	1,3	0,53	2	2	asimétrico
11	1	8,94	3,12	6,61	1,72	0,98	0,56	0,16	0,19	7	6	1,76	0,79	1,8	0,84	3	1	
12	1	18,18	4,05	8,87	2,32	1,85	0,74	0,12	0,12	7	7	2,6	1,23	falta	falta	3	3	
13	0	13,43	3,55	7,47	2,01	0,95	0,64	0,14	0,13	7	8	2,35	0,95	2,31	0,99	2	2	asimétrico
14	0	39,64	4,75	9,73	2,87	1,37	0,71	0,2	0,22	8	7	4,9	1,96	4,63	1,85	3	3	asimétrico
15	1	18,05	4,02	8,79	2,4	1,29	0,71	0,13	0,14	7	7	2,07	1,1	1,62	1,21	3	2	
16	1	1,65	1,78	3,87	0,91	0,64	0,32	0,06	0,09	8	7	0,97	0,34	1,02	0,37	1	2	
17	1	10,62	3,32	7,37	1,82	1,07	0,6	0,09	0,12	6	5	1,92	0,89	1,8	0,77	1	2	
18	1	9,33	3,21	7,12	0,85	0,99	0,62	0,14	0,2	5	7	1,74	0,45	0,84	0,32	2	2	
19	0	11,04	3,32	6,94	1,82	1,05	0,57	0,13	0,18	7	7	2,04	0,87	2,08	0,84	2	2	asimétrico
20	1	9,19	3,17	6,87	1,74	0,93	0,58	0,12	0,16	8	9	1,8	0,77	1,77	0,8	1	1	
21	0	8,92	3,36	6,94	1,77	0,93	0,59	0,17	0,15	7	6	1,22	0,42	0,92	0,3	3	1	asimétrico
22	1	14,48	3,94	8,49	2,17	1,17	0,74	0,12	0,16	8	6	falta	falta	falta	falta	2	3	
23	0	13,16	3,54	7,4	2	1	0,6	0,14	0,18	7	7	2,75	1,34	1,61	0,5	1	1	asimétrico
24	0	23,43	4,01	8,4	2,55	1,19	0,68	0,15	0,17	9	7	3,4	1,56	3,47	1,65	2	2	asimétrico
25	0	22,48	4,12	8,57	2,3	1,11	0,71	0,15	0,22	7	8	3,16	1,42	3,1	1,43	2	2	asimétrico
26	1	10,78	3,32	7,3	1,85	0,9	0,62	0,14	0,17	9	7	2,25	0,97	1,68	0,57	2	2	
27	0	11,83	3,4	7,35	1,92	0,98	0,58	0,15	0,18	8	7	2,18	0,9	2,22	0,93	2	2	asimétrico
28	1	12,47	3,47	7,6	1,95	1,16	0,6	0,13	0,11	7	7	2,2	0,92	2,2	0,92	4	2	
29	0	14,46	3,65	7,78	2,07	1,12	0,66	0,08	0,17	5	7	2,57	1,13	2,5	1,13	1	2	asimétrico
30	1	11,16	3,41	7,1	1,97	1	0,66	0,17	0,16	7	8	falta	falta	1,75	0,82	2	1	
31	1	10,58	3,21	7,2	1,82	0,97	0,66	0,12	0,16	8	6	2,06	0,92	2,1	0,94	1	1	
32	1	4,13	2,45	5,2	1,26	0,85	0,49	0,1	0,12	8	6	1,4	0,54	1,53	0,64	2	3	
33	1	10,01	3,27	7,22	1,9	1,02	0,6	0,17	0,17	9	7	1,92	0,82	1,05	0,34	4	3	
34	1	12,02	3,46	7,42	1,96	1,19	0,62	0,15	0,2	7	8	1,85	0,74	1,97	0,72	3	2	
35	1	11,66	3,42	7,26	1,85	1,1	0,66	0,11	0,14	7	7	2,03	0,77	2,12	0,92	2	2	
36	1	2,5	2,05	4,41	1,07	0,67	0,37	0,05	0,1	6	5	1,12	0,45	1,05	0,47	2	1	
37	1	8,14	3,16	6,46	1,8	0,93	0,67	0,13	0,14	4	5	1,03	0,34	1,46	0,47	2	2	
38	0	9,49	3,31	6,9	1,85	1,01	0,55	0,15	0,2	6	7	falta	falta	1,08	0,37	4	2	asimétrico
39	1	8,54	3,06	6,6	1,7	1,02	0,6	0,1	0,15	8	9	falta	falta	1,88	0,82	2	3	
40	1	9,19	3,11	6,5	1,85	1,01	0,57	0,11	0,13	7	9	1,8	0,77	1,96	0,9	3	3	
41	0	2,07	1,99	4,3	1,01	0,7	0,38	0,09	0,08	7	6	1,2	0,5	0,9	0,36	1	2	asimétrico

Caracterización morfométrica de *A. pallipes* de la población de A. Ermitas (GRA). En la parte superior se indica el código, localidad a la que pertenece y fecha de muestreo de la población.

Río: Arroyo Guztar

Localidad:Padrones de Bureba (Burgos)

Código: GUZ

Fecha: 17/06/99

Nº	SEXO	PESO (g)	LCF (cm)	LT (cm)	ACF (cm)	LROS (cm)	ABASROS (cm)	AAPROS (cm)	LAP (cm)	IESP3MAX	DESP 3MAX	ILPINZA (cm)	IAPINZA (cm)	DLPINZA (cm)	DAPINZA (cm)	IESP CER	DESP CER	LOB. PLEOP.
1	0	14,13	3,63	7,37	2,01	1,81	1,27	0,66	0,16	8	8	2,92	1,23	2,87	1,25	4	4	asimétrico
2	0	8,95	3,18	6,64	1,72	1,52	1,06	0,57	0,15	6	7	2,19	0,88	2,14	0,96	1	1	asimétrico
3	0	28,8	4,38	8,94	2,43	2	1,21	0,66	0,22	9	9	4,23	1,64	4,12	1,72	2	4	asimétrico
4	0	9,11	3,25	6,67	1,75	1,55	1,11	0,62	0,11	6	7	2,24	0,95	2,16	0,97	2	2	asimétrico
5	0	13,44	3,48	7,16	1,91	1,71	1,15	0,56	0,14	6	6	2,8	1,22	2,77	1,23	2	2	asimétrico
6	0	17,37	3,77	7,76	2,14	1,8	1,25	0,63	0,11	8	7	3,03	1,43	3,16	1,45	2	2	asimétrico
7	1	7,54	2,97	6,17	1,65	1,72	1,02	0,52	0,1	6	8	1,76	0,8	1,7	0,8	2	2	
8	1	9,26	3,43	6,87	0,78	1,99	1,19	0,67	0,11	7	9	1,49	0,85	falta	falta	3	4	
9	0	19,52	3,72	8,25	2,11	1,94	1,16	0,67	0,16	6	7	3,2	1,34	3,2	1,4	2	3	asimétrico
10	0	16,59	3,6	7,73	1,97	1,82	1,01	0,65	0,12	7	8	falta	falta	3,22	1,43	1	1	asimétrico
11	0	8,19	3,07	6,5	1,6	1,51	0,97	0,67	0,14	8	7	2,12	0,87	2,12	0,87	2	2	asimétrico
12	1	16,4	3,75	7,75	2,22	2,39	1,2	0,62	0,13	6	8	2,31	1,1	2,3	1,09	3	3	
13	1	9,17	3,17	6,82	1,72	1,93	1,04	0,54	0,11	7	6	1,85	0,8	1,89	0,93	2	3	
14	0	8,07	3,1	6,29	1,61	1,54	1	0,56	0,11	7	6	2,07	0,89	2,19	0,89	2	2	asimétrico
15	1	9,7	3,12	6,84	1,7	1,87	0,95	0,57	0,14	7	5	1,89	0,92	1,85	0,96	2	2	
16	0	12,59	3,43	7,16	1,82	1,74	1,13	0,57	0,1	7	8	2,66	1,16	2,64	1,19	2	2	asimétrico
17	0	19,44	4,22	8,43	2,27	2	1,3	0,67	0,13	falta	9	falta	falta	3,72	1,5	1	1	asimétrico
18	0	10,33	3,24	6,63	1,76	1,62	1,06	0,54	0,12	7	7	2,43	1,08	2	0,69	3	3	asimétrico
19	1	7,83	3,15	6,13	1,57	2,72	1,12	0,52	0,11	6	6	1,84	0,84	1,87	0,82	2	2	
20	1	11,37	3,22	6,63	1,84	2,03	0,97	0,62	0,12	8	7	2,21	0,95	2,12	0,95	3	3	
21	1	14,1	3,75	7,97	1,97	2,25	1,3	0,64	0,07	7	7	2,53	1,05	2,5	1,03	2	2	
22	0	9,66	3,13	6,6	1,66	1,67	0,95	0,55	0,15	7	7	2,37	1	2,37	0,95	2	2	asimétrico
23	0	10,28	2,99	6,47	1,72	1,58	0,94	0,51	0,14	8	7	2,36	1,07	2,31	1,09	1	1	asimétrico
24	0	9,58	3,3	6,9	1,8	1,62	1,05	0,55	0,11	8	7	falta	falta	2,47	1,05	1	2	asimétrico
25	0	15,38	3,51	7,55	1,92	1,77	1	0,68	0,1	9	8	2,77	1,32	2,87	1,3	2	3	asimétrico
26	0	10,77	3,25	6,91	1,77	1,66	0,98	0,64	0,08	8	8	2,49	1,08	2,4	1,07	2	2	asimétrico
27	0	7,77	3	6,22	1,62	1,5	0,89	0,47	0,11	9	7	1,77	0,9	1,96	0,92	5	5	asimétrico
28	0	23,52	4,08	8,47	2,26	1,87	1,12	0,6	0,12	6	8	3,5	1,66	3,6	1,66	2	2	asimétrico
29	1	11,89	3,41	7,26	1,85	2,03	1,06	0,6	0,1	8	7	2	1,02	2,01	1	1	2	
30	1	12,98	3,55	7,7	2	2,1	1,12	0,57	0,1	5	7	1,89	0,7	2,07	1,02	2	2	
31	0	15,5	3,5	7,35	1,99	1,79	0,98	0,63	0,12	7	9	2,86	1,24	2,84	1,26	1	1	asimétrico
32	1	11,36	3,41	7,14	1,92	2,06	1,2	0,6	0,1	7	6	2,14	1	1,76	0,71	2	2	
33	0	16,57	3,68	7,5	2,01	1,78	1,21	0,63	0,12	8	7	2,99	1,36	2,9	1,38	1	1	asimétrico
34	1	8,71	3,2	6,58	1,72	2	1,1	0,52	0,11	7	7	2	0,9	1,92	0,85	1	1	
35	1	10,4	3,27	7,27	1,8	2	1,13	0,6	0,12	6	8	2,07	1	1,96	0,91	3	2	
36	0	10,99	3,34	6,95	1,89	1,74	1,07	0,56	0,12	6	8	2,39	1,05	2,35	1,11	2	2	asimétrico
37	0	9,78	3,01	6,42	1,74	1,63	0,95	0,5	0,1	6	6	2,11	1	2,16	1	2	3	asimétrico
38	0	14,29	3,5	7,07	1,94	1,77	1,17	0,6	0,12	7	6	2,82	1,3	2,72	1,25	2	1	asimétrico
39	1	13,11	3,74	8	2,15	2,26	1,1	0,66	0,13	6	2	2,36	1,1	2,29	1	2	2	
40	1	7,77	2,96	6,57	1,63	1,83	1,07	0,53	0,1	6	5	1,82	0,85	1,8	0,83	2	2	

Caracterización morfométrica de *A. pallipes* de la población de A. Guztar (GUZ). En la parte superior se indica el código, localidad a la que pertenece y fecha de muestreo de la población.

Río: Laguna Valsemana

Localidad: Lugán (León)

Código: LEO

Fecha: 11/06/99

Nº	SEXO	PESO (g)	LCF (cm)	LT (cm)	ACF (cm)	LROS (cm)	ABASROS (cm)	AAPROS (cm)	LAP (cm)	IESP3MAX	DESP 3MAX	ILPINZA (cm)	IAPINZA (cm)	DLPINZA (cm)	DAPINZA (cm)	IESP CER	DESP CER	LOB. PLEOP.
1	1	16,79	3,92	8,55	2,17	1,91	1,16	0,7	0,17	7	6	2,48	0,96	2,46	1,02	3	3	
2	0	14,82	4	8,02	2,16	1,82	1,2	0,66	0,12	8	6	2,11	0,64	2,51	0,93	3	2	asimétrico
3	0	14,3	3,77	7,57	2,16	1,9	1,26	0,63	0,14	7	6	2,67	0,92	2,65	0,92	3	2	asimétrico
4	1	14,95	3,8	8	2,1	1,84	1,21	0,64	0,14	7	6	2,24	0,92	2,23	0,95	3	3	
5	0	17,21	4,05	8,22	2,25	1,99	1,11	0,67	0,14	6	6	2,71	0,96	2,72	1,01	4	4	asimétrico
6	0	17,29	4,14	8,58	2,29	2,03	1,32	0,68	0,16	7	6	2,68	0,78	2,8	0,75	3	2	asimétrico
7	0	20,13	4,16	8,52	2,34	2,08	1,18	0,67	0,18	5	4	2,81	1,04	2,86	1,08	2	3	asimétrico
8	0	25,78	4,47	8,99	2,64	2,38	1,21	0,7	0,1	6	7	3,46	1,34	3,57	1,35	3	3	asimétrico
9	0	26,44	4,38	9,01	2,42	2,16	1,21	0,69	0,16	8	6	3,8	1,36	4,2	1,6	3	4	asimétrico
10	1	18,08	4,15	8,73	2,34	2,08	1,22	0,72	0,19	5	7	2,62	1,04	2,7	1,03	5	5	
11	0	25,3	4,65	8,47	2,69	2,43	1,25	0,71	0,18	6	7	3,05	1,09	3,01	1,15	2	2	asimétrico
12	1	14,3	3,67	7,94	2,13	1,87	1,08	0,63	0,17	6	6	2,28	0,95	2,21	0,93	3	4	
13	0	29,82	4,6	9,47	2,66	2,4	1,16	0,7	0,11	7	8	4,01	1,47	4,26	1,66	4	3	asimétrico
14	0	36,84	5,03	10,69	2,87	2,61	1,32	0,77	0,13	8	7	4,43	1,53	4,6	1,56	3	2	asimétrico
15	1	17,35	4	8,81	2,31	2,05	1,08	0,67	0,11	6	6	2,36	0,8	2,7	1,01	4	4	
16	1	15,41	3,9	8,68	2,19	1,93	0,93	0,66	0,12	6	5	2,24	0,87	1,8	0,61	2	2	
17	1	23,29	4,43	9,67	2,47	2,21	1,34	0,75	0,15	6	7	2,65	1,2	2,65	1,16	4	4	
18	0	12,26	3,66	7,7	2,06	1,8	0,87	0,64	0,12	6	6	2,25	0,71	2,2	0,7	3	3	asimétrico
19	0	13,13	3,55	7,38	2	1,74	1,02	0,6	0,12	7	5	2,7	1,1	2,55	0,93	3	3	asimétrico
20	0	18,58	3,5	7,2	1,9	1,64	0,91	0,6	0,11	6	7	2,37	1,07	2,46	0,95	3	2	asimétrico
21	0	38,76	5,02	10,2	2,88	2,62	1,41	0,8	0,15	6	7	4,66	1,46	5,1	1,9	2	2	asimétrico
22	1	16,06	4,05	8,71	2,21	1,95	1,18	0,67	0,14	4	6	2,31	0,9	2,25	0,82	2	2	asimétrico
23	0	38,96	4,86	10	2,76	2,5	1,3	0,8	0,13	7	8	4,7	1,85	4,84	1,87	5	5	asimétrico
24	1	22,48	4,51	9,52	2,52	2,26	1,18	0,75	0,12	7	6	2,78	0,99	2,78	1,08	7	4	
25	0	28,61	4,54	8,62	2,62	2,36	1,08	0,67	0,2	7	6	3,58	1,3	3,7	1,4	3	3	asimétrico
26	0	13,96	3,7	7,74	1,96	1,7	1,03	0,6	0,11	6	6	2,67	1,11	2,65	1,17	4	4	asimétrico
27	0	11,19	3,4	7,3	1,86	1,6	1,15	0,6	0,12	7	5	2,4	1,02	1,82	0,65	4	4	asimétrico
28	1	11,85	3,55	7,96	1,91	1,65	1,03	0,62	0,16	6	6	1,92	0,75	1,72	0,56	5	5	
29	0	21,24	4,24	8,8	2,34	2,02	1,16	0,66	0,15	6	7	3,05	1,1	3,26	1,26	5	5	asimétrico
30	1	21,05	4,37	9,46	2,5	2,24	1,4	0,73	0,13	8	6	2,55	1,01	2,7	1,1	5	6	asimétrico
31	1	13,33	3,77	8,11	2,03	1,77	1,08	0,66	0,14	5	5	2	0,85	2	0,77	2	4	
32	1	19,25	4,17	8,97	2,34	2,04	1,21	0,69	0,11	6	5	2,44	1	2,46	1,03	3	3	
33	1	14,03	3,7	8,1	2,05	1,79	1,15	0,61	0,15	6	6	2	0,87	2,14	0,86	2	2	
34	1	18,09	4,11	8,82	2,26	2	1,19	0,7	0,12	6	6	2,5	1,01	2,67	1,01	3	3	
35	1	17,45	3,95	8,64	2,24	1,98	1,14	0,8	0,07	5	6	2,34	1,05	2,42	1,04	3	3	
36	1	20,86	4,23	8,92	2,42	2,06	1,15	0,76	0,11	6	5	2,57	1,1	2,66	1,09	2	3	
37	0	31,35	4,94	9,85	2,77	2,51	1,4	0,74	0,14	7	7	3,56	1,34	3,65	1,4	2	2	asimétrico
38	1	15	3,99	8,67	2,12	1,86	1,2	0,64	0,12	6	6	2,44	0,92	falta	falta	2	3	
39	1	14,1	3,8	8	2,14	1,88	1,11	0,66	0,12	7	6	1,92	0,91	2	0,89	3	3	
40	1	17,01	4,08	8,64	2,27	2,01	1,19	0,67	0,13	7	6	1,15	0,46	2,22	0,9	4	4	
41	1	15,18	3,83	9,37	2,14	1,65	1,13	0,69	0,15	6	8	2,05	0,7	2,26	0,9	3	3	

Caracterización morfométrica de *A. pallipes* de la población de L. Valsemana (LEO). En la parte superior se indica el código, localidad a la que pertenece y fecha de muestreo de la población.

Río: Manantial de la Madalena

Localidad: Rebolledo de Traspesña (Burgos)

Código: MAD

Fecha: 17/06/99

Nº	SEXO	PESO (g)	LCF (cm)	LT (cm)	ACF (cm)	LROS (cm)	ABASROS (cm)	AAPROS (cm)	LAP (cm)	IESP3MAX	DESP 3MAX	ILPINZA (cm)	IAPINZA (cm)	DLPINZA (cm)	DAPINZA (cm)	IESP CER	DESP CER	LOB. PLEOP.
1	0	8,8	3,37	6,54	1,78	1,68	1,13	0,6	0,1	5	6	1,95	0,6	2,31	0,91	3	3	asimétrico
2	0	8,86	3,24	6,88	1,82	1,59	1	0,62	0,09	6	7	falta	falta	2,3	0,92	1	1(?)	asimétrico
3	1	7,71	2,94	6,52	1,62	1,76	1,06	0,58	0,1	3	5	1,81	0,75	1,62	0,7	2	2	
4	0	8,58	3,13	6,78	1,71	1,52	1	0,55	0,11	6	7	1,99	0,91	1,97	0,9	3	3	asimétrico
5	0	9,34	3,49	7,1	1,73	1,59	1,1	0,59	0,11	5	6	falta	falta	2,36	0,92	1	2	asimétrico
6	0	16,31	4,04	8,06	2,18	1,84	1,1	0,63	0,1	8	8	3,06	1,11	falta	falta	1	1	asimétrico
7	0	13,43	3,67	7,65	2,07	1,76	1,09	0,67	0,12	7	6	2,47	0,96	2,56	1	2	2	asimétrico
8	0	10,26	3,4	7,07	1,8	1,61	1,05	0,57	0,12	6	7	2,22	0,87	2,36	0,91	2	2	asimétrico
9	0	14,85	3,82	7,95	2,07	1,84	1,2	0,63	0,08	6	4	2,5	1,04	2,56	1	2	2	asimétrico
10	0	10,95	3,42	7,13	1,85	1,7	1,01	0,59	0,09	8	9	2,21	0,89	2,26	0,94	2	2	asimétrico
11	0	13,43	3,8	7,25	2,07	1,82	1,1	0,64	0,1	6	4	2,71	1,02	2,44	0,87	3	3	asimétrico
12	0	7,96	3,13	6,46	1,67	1,55	1	0,54	0,12	6	7	2,29	0,9	2,32	0,93	3	4	asimétrico
13	0	17,98	4,03	8,22	2,2	1,91	1,08	0,62	0,13	7	5	falta	falta	3,52	1,34	1	1	asimétrico
14	0	7,84	3,01	6,36	1,58	1,43	0,96	0,54	0,1	5	6	2	0,82	1,9	0,84	2	2	asimétrico
15	0	9,57	3,29	6,7	1,73	1,52	1,08	0,54	0,12	5	6	2,31	0,93	2,06	0,86	3	3	asimétrico
16	0	8,2	3,12	6,26	1,62	1,5	1,01	0,52	0,11	6	6	2,02	0,93	1,76	0,6	2	2	asimétrico
17	0	12,89	3,62	7,6	2,03	1,63	1,12	0,61	0,1	5	6	falta	falta	2,6	1,13	2	1	asimétrico
18	0	13,98	3,6	7,37	2	1,6	0,97	0,63	0,1	7	6	2,87	1,26	2,52	0,95	1	1	asimétrico
19	0	14,71	3,52	7,5	1,95	1,73	1,12	0,64	0,12	5	8	2,74	1,22	2,64	1,2	1	1	asimétrico
20	0	8,83	3,07	6,66	1,7	1,5	0,95	0,52	0,13	6	6	2,03	0,73	2,16	0,9	2	3	asimétrico
21	0	12,45	3,57	7,12	1,88	1,66	1,04	0,61	0,12	7	6	2,44	0,9	2,57	1,06	2	1	asimétrico
22	0	9,03	3,44	7,4	2,92	1,65	1,04	0,63	0,13	8	7	falta	falta	falta	falta	2	2	asimétrico
23	0	10,77	3,41	6,6	1,9	1,63	1,02	0,59	0,08	5	6	2,3	0,09	2,16	0,77	3	3	asimétrico
24	0	11,13	3,29	6,95	1,82	1,65	1,06	0,52	0,09	6	6	2,32	1	2,28	1,07	2	2	asimétrico
25	0	12,38	3,54	7,23	1,96	1,6	1,02	0,69	0,1	6	6	2,55	1,08	2,54	1,1	3	4	asimétrico
26	0	10,1	3,25	6,8	1,73	1,56	1,01	0,57	0,1	5	6	2,27	1,07	2,18	1,01	2	2	asimétrico
27	0	10,08	3,32	6,77	1,71	1,6	1,08	0,57	0,11	5	5	2,2	1	2,2	0,97	1	1	asimétrico
28	0	16,27	4,84	7,85	2,11	1,7	1,1	0,65	0,14	6	7	3,22	1,17	3,02	1,06	2	2	asimétrico
29	0	7,95	3,05	6,31	1,57	1,43	0,9	0,55	0,11	6	6	1,89	0,64	2,03	0,8	2	2	asimétrico
30	0	8,06	3,27	6,77	1,74	1,52	1,01	0,56	0,1	6	5	falta	falta	2,22	0,8	1	2	asimétrico
31	0	11,63	3,46	7,25	1,89	1,65	1,11	0,6	0,12	7	7	2,21	0,9	2,41	0,96	3	3	asimétrico
32	0	9	3,14	6,66	1,67	1,5	0,87	0,54	0,11	6	6	2,05	0,8	2,07	0,85	2	2	asimétrico
33	0	8,91	3,11	6,65	1,68	1,52	1	0,52	0,13	7	5	2,1	0,88	2,16	0,96	4	4	asimétrico
34	0	12,97	3,57	7,61	1,92	1,63	1,06	0,6	0,14	7	7	2,52	0,95	2,37	0,92	3	3	asimétrico
35	0	10,82	3,27	7,02	1,71	1,56	0,99	0,57	0,1	6	7	2,26	0,97	2,17	0,97	3	3	asimétrico
36	0	9,57	3,2	6,67	1,72	1,52	0,95	0,56	0,12	5	6	2,25	0,94	2,27	0,97	6	5	asimétrico
37	0	10,06	3,42	6,87	1,87	1,6	0,93	0,54	0,13	6	5	1,8	0,62	2,32	0,85	1	1	asimétrico
38	0	16,18	4,83	8,12	2,05	1,73	1	0,7	0,11	7	5	3,22	1,47	falta	falta	2	2	asimétrico
39	0	9,55	3,3	6,81	1,83	1,55	1,05	0,57	0,1	7	8	2,07	0,79	2,13	0,97	3	1	asimétrico
40	0	19,51	3,85	8,3	2,22	1,84	1,12	0,67	0,12	8	9	3,23	1,2	3,2	1,27	1	1	asimétrico

Caracterización morfométrica de *A. pallipes* de la población de M. Madalena (MAD). En la parte superior se indica el código, localidad a la que pertenece y fecha de muestreo de la población.

Río: Río Ega

Localidad: (Navarra)

Código: NAV

Fecha: 08/10/98

Nº	SEXO	PESO (g)	LCF (cm)	LT (cm)	ACF (cm)	LROS (cm)	ABASROS (cm)	AAPROS (cm)	LAP (cm)	IESP3MAX	DESP 3MAX	ILPINZA (cm)	IAPINZA (cm)	DLPINZA (cm)	DAPINZA (cm)	IESP CER	DESP CER	LOB. PLEOP.
1	0	16,5	3,6	7,36	2,06	1,8	1,02	0,62	0,14	6	6	3,04	1,46	2,91	1,25	2	2	asimétrico
2	1	12,26	3,47	7,48	1,95	1,69	0,98	0,57	0,12	6	6	1,42	0,49	2	0,9	3	4	
3	1	27	4,63	9,88	2,67	2,41	1,21	0,74	0,19	6	6	2,78	1,06	2,73	1,14	4	4	
4	0	27,54	4,26	8,8	2,51	2,25	1,37	0,76	0,17	6	6	3,47	1,67	3,38	1,63	2	2	asimétrico
5	0	12,06	3,45	6,64	1,9	1,64	1,08	0,63	0,13	8	8	1,05	0,42	2,93	1,14	2	2	asimétrico
6	1	16,77	3,81	8,12	2,2	1,94	1,21	0,67	0,15	6	7	2,22	1,07	2,27	1,14	2	4	
7	1	23,3	4,32	8,98	2,48	2,22	1,4	0,72	0,18	7	7	2	1,08	2,94	1,35	3	3	
8	0	38,96	4,64	9,47	2,78	2,52	1,3	0,77	0,19	8	8	4,26	1,92	4,37	1,94	3	3	asimétrico
9	1	17,08	4,95	7,88	2,25	1,99	1,14	0,64	0,14	7	5	2,46	1,08	2,47	1,13	4	5	
10	0	35,24	4,65	8,93	2,54	2,28	1,3	0,74	0,18	6	8	4	1,94	3,88	1,82	2	2	asimétrico
11	0	35,23	4,58	8,95	2,63	2,37	1,28	0,74	0,21	5	5	3,98	1,97	3,89	1,96	3	3	asimétrico
12	1	23,2	4,26	9,03	2,48	2,04	1,24	0,76	0,2	6	6	2,68	1,28	2,7	1,26	3	4	
13	0	33,85	4,74	9,67	2,79	2,53	1,37	0,76	0,22	8	8	3,7	1,6	3,72	1,61	1	1	asimétrico
14	1	18,69	4,12	8,71	2,44	2,18	1,25	0,7	0,19	8	8	2,48	0,87	falta	falta	3	2	
15	1	6,94	2,83	6,14	1,58	1,32	1	0,54	0,12	4	4	falta	falta	1,68	0,82	4	4	
16	1	19,79	4,14	8,53	2,27	2,01	1,37	0,67	0,16	8	8	2,5	1,17	2,5	1,28	3	4	
17	1	14,54	3,9	8,04	2,2	1,78	1,23	0,66	0,17	6	8	2,33	1,03	1,14	0,42	4	3	
18	1	19,4	3,91	8,58	2,29	2,03	1,27	0,68	0,17	5	7	2,6	1,27	2,1	0,83	2	2	
19	1	22,59	4,09	9,07	2,44	1,18	1,27	0,74	0,2	6	5	2,7	1,34	2,63	1,25	4	3	
20	1	23,39	4,3	9,21	2,45	2,19	1,32	0,73	0,22	7	7	2,61	1,27	2,61	1,2	5	4	
21	0	12,24	3,45	7,1	1,93	1,67	1,13	0,57	0,21	6	7	2,28	1	2,27	0,94	3	3	asimétrico
22	1	26,86	4,37	9	2,66	2,11	1,21	0,74	falta	6	6	3,08	1,36	2,94	1,12	4	3	
23	1	13,92	3,54	7,65	2,01	1,75	1	0,6	0,2	7	5	2	1	1,94	0,95	1	1	
24	1	19,23	3,97	8,67	2,3	2,04	1,2	0,64	0,14	6	7	2,38	1,24	2,4	1,21	3	3	
25	0	23,91	4,33	8,88	2,5	2,24	1,15	0,71	0,2	7	7	3,07	1,3	2,96	1,32	2	3	asimétrico
26	0	33,11	4,67	9,28	2,66	2,4	1,3	0,75	0,21	9	8	4,26	1,89	4,17	1,54	4	4	asimétrico
27	0	33,64	4,3	8,85	2,61	2,35	0,94	0,68	falta	9	9	4,42	1,85	4	1,64	2	2	asimétrico

Caracterización morfométrica de *A. pallipes* de la población de R. Ega (NAV). En la parte superior se indica el código, localidad a la que pertenece y fecha de muestreo de la población.

Río: Arroyo Pozuelo

Localidad: (Cuenca)

Código: POZ

Fecha: 25/07/98

N°	SEXO	PESO (g)	LCF (cm)	LT (cm)	ACF (cm)	LROS (cm)	ABASROS (cm)	AAPROS (cm)	LAP (cm)	IESP3MAX	DESP 3MAX	ILPINZA (cm)	IAPINZA (cm)	DLPINZA (cm)	DAPINZA (cm)	IESP CER	DESP CER	LOB. PLEOP.
1	1	5,88	2,76	5,86	1,42	1,16	0,68	0,47	0,1	4	5	1,48	0,66	1,63	0,68	2	2	
2	1	6,11	2,75	5,66	1,44	1,18	0,74	0,5	0,11	6	6	1,59	0,66	1,5	0,62	1	1	
3	1	6,07	2,75	6,01	1,45	1,19	0,82	0,5	0,8	3	3	1,65	0,66	1,62	0,64	1	1	
4	0	9,86	3,2	5,97	1,68	1,42	0,7	0,54	0,12	7	8	2,67	0,86	2,63	0,92	2	2	asimétrico
5	0	8,6	3,13	6,65	1,63	1,37	0,92	0,54	0,9	5	2	2,28	0,9	2,06	0,74	2	1	asimétrico
6	0	12,61	3,36	6,57	1,83	1,57	0,99	0,55	0,11	7	8	2,9	1,12	2,97	1,16	1	1	asimétrico
7	0	22,48	4,16	8,02	2,43	2,17	1,13	0,66	0,12	4	2	3,83	1,36	3,75	1,87	1	1	asimétrico
8	0	16,73	3,72	7,28	2,11	1,85	1,02	0,62	0,15	7	6	3,48	1,44	3,57	1,37	1	1	asimétrico
9	1	7,55	2,97	6,3	1,67	1,41	0,76	0,54	0,11	4	4	1,68	0,7	1,64	0,53	2	1	
10	0	15,99	3	7,15	2,12	1,86	1,04	0,62	0,12	9	7	3,17	1,2	3,29	1,24	1	2	asimétrico
11	1	8,06	3,01	6,7	1,65	1,39	0,91	0,56	0,1	5	3	1,57	0,62	1,54	0,55	1	1	
12	0	4,63	2,63	5,52	1,42	1,04	0,72	0,44	0,9	2	2	1,72	0,64	1,71	0,64	1	1	asimétrico
13	1	4,58	2,53	5,4	1,36	1,1	0,82	0,46	0,8	4	4	1,41	0,61	1,15	0,57	1	1	
14	0	9,29	3,32	6,73	1,85	1,59	0,9	0,56	0,11	6	5	2,62	1,08	2,42	1,02	1	2	asimétrico
15	0	10,22	3,29	6,33	1,8	1,54	1,04	0,6	0,1	6	6	2,5	0,95	2,26	0,84	1	1	asimétrico
16	1	6,06	2,78	5,53	1,45	1,24	0,7	0,48	0,1	1	2	1,63	0,68	1,57	0,66	1	2	
17	0	16,19	3,88	7,76	2,26	2	1,15	0,7	0,13	6	6	2,71	0,99	2,81	1,08	2	1	asimétrico
18	0	8,63	3,1	6,25	1,63	1,37	0,86	0,53	0,11	6	7	2,28	0,93	2,1	0,72	1	1	asimétrico
19	0	26,41	4,52	8,62	2,59	2,33	1,21	0,82	0,1	6	6	4,66	2,71			1	11	asimétrico
20	0	8,62	3,07	6,25	1,65	1,15	0,82	0,48	0,9	5	5	2,35	0,86	2,4	0,92	1	1	asimétrico
21	0	12,28	3,56	6,72	1,92	1,66	0,96	0,59	0,8	5	6	2,61	0,96	2,52	0,81	1	1	asimétrico
22	0	10,76	3,34	6,26	1,76	1,5	0,86	0,54	0,9	5	5	2,34	0,9	2,74	0,85	1	1	asimétrico
23	1	6,53	2,92	6,4	1,52	1,26	0,93	0,5	0,7	5	4	1,87	0,67	1,84	0,7	1	1	
24	0	5,85	2,87	5,55	1,46	1,2	0,82	0,44	0,1	6	6	1,93	0,72	0,92	0,33	1	1	asimétrico
25	0	9,85	3,28	6,4	1,76	1,43	0,95	0,59	0,12	6	7	2,38	0,95	2,35	0,81	2	2	asimétrico
26	0	10,31	3,34	6,85	1,79	1,53	1,02	0,57	0,12	4	5	2,23	0,85	2,23	0,9	1	1	asimétrico
27	0	10,31	3,29	6,67	1,8	1,34	0,87	0,55	0,1	6	7	2,52	0,96	2,47	0,93	2	1	asimétrico
28	0	7,82	3,02	5,78	1,62	1,36	0,86	0,57	0,8	4	4	1,95	0,74	2	0,68	1	1	asimétrico
29	1	5,03	2,57	5,55	1,5	1,24	0,85	0,5	0,3	6	5	1,52	0,56	1,45	0,59	1	1	
30	1	5,3	2,7	5,8	1,42	1,23	0,77	0,49	0,1	5	7	1,45	0,57	1,4	0,54	1	1	
31	1	6,86	3,06	6,56	1,58	1,32	0,92	0,54	0,8	5	5	1,34	0,47	1,76	0,67	1	2	
32	0	9,79	3,28	6,43	1,8	1,02	1	0,53	0,8	6	5	2,57	0,94	2,5	0,9	1	1	asimétrico
33	0	8,78	3,11	6,08	1,66	1,4	0,94	0,53	0,9	4	4	2,32	0,95	2,32	0,95	2	1	asimétrico
34	1	5,81	2,9	6	1,5	1,24	0,84	0,52	0,11	5	4	1,56	0,62	1,72	0,61	1	1	
35	0	9,59	2,9	6,18	1,77	1,51	0,9	0,55	0,9	4	1	2,24	0,9	2,16	0,7	1	1	asimétrico
36	0	10,16	3,26	6,37	1,72	1,46	0,94	0,58	0,8	3	4	2,3	0,94	2,25	0,86	2	2	asimétrico
37	1	4,74	3,26	5,37	1,4	1,14	0,8	0,44	0,8	4	5	1,71	0,57	1,7	0,56	1	1	
38	0	6,93	2,6	6	1,52	1,24	1	0,45	0,9	4	5	2,17	0,85	2,17	0,84	2	2	asimétrico
39	1	6,05	2,98	6	1,49	1,23	0,9	0,65	0,9	4	4	1,62	0,6	1,62	0,6	2	2	
40	1	6,6	2,72	5,9	1,6	1,34	0,9	0,55	0,9	3	6	1,7	0,7	1,2	0,45	2	2	
41	1	5,54	2,93	5,95	1,45	0,99	0,86	0,47	0,11	5	5	1,27	0,48	1,5	0,6	2	2	

Caracterización morfométrica de *A. pallipes* de la población de A. Pozuelo (POZ). En la parte superior se indica el código, localidad a la que pertenece y fecha de muestreo de la población.

Río: R. Nervión

Localidad: Altuve (Álava)

Código: PVS

Fecha: 29/08/00

Nº	SEXO	PESO (g)	LCF (cm)	LT (cm)	ACF (cm)	LROS (cm)	ABASROS (cm)	AAPROS (cm)	LAP (cm)	IESP3MAX	DESP 3MAX	ILPINZA (cm)	IAPINZA (cm)	DLPINZA (cm)	DAPINZA (cm)	IESP CER	DESP CER	LOB. PLEOP.
1	1	10,51	3,52	7,5	-	1,1	1,2	0,56	0,11	6	7	2	0,87	1,7	0,63	?	?	-
2	0	3,8	2,52	5,22	1,36	1,09	0,93	0,45	0,09	5	5	1,56	0,67	1,35	0,52	4	3	asimétrico
3	0	3,91	2,55	5,47	1,35	-	-	0,44	-	5	6	-	-	1,77	0,72	3	3	asimétrico
4	1	2,52	2,76	4,79	1,12	0,86	0,83	0,42	0,1	5	3	1,34	0,55	1,29	0,52	4	4	-
5	1	4,34	2,75	5,71	1,42	1,16	0,85	0,5	0,12	6	5	1,51	0,65	1,62	0,6	3	3	-
6	1	3,54	2,46	5,24	1,26	1	0,77	0,48	0,09	4	5	1,43	0,57	1,36	0,6	2	2	-
7	0	4,59	2,64	5,65	1,9	1,64	0,95	0,46	0,12	5	8	1,54	0,67	1,58	0,68	2	3	asimétrico
8	0	10,15	3,7	7,52	2	1,74	1,29	0,63	0,12	6	7	-	-	2,65	1,65	5	-	asimétrico
9	1	13,35	4,02	8,41	2,19	1,93	1,31	0,76	0,19	-	-	2,71	1,21	2,47	1,22	2	2	-
10	0	35,64	4,8	9,55	2,64	2,38	1,57	0,8	0,13	8	7	4,42	1,65	4,8	2,07	2	4	asimétrico
11	0	2,98	2,3	4,96	1,15	0,89	0,86	0,4	0,11	5	4	1,4	0,57	1,4	0,51	1	1	asimétrico
12	1	4,02	2,51	5,42	1,32	1,06	1,04	0,46	0,1	5	5	1,55	0,56	1,55	0,61	4	3	-
13	1	11,69	3,7	7,82	1,96	1,7	1,2	0,65	0,14	7	6	2,2	0,9	2,19	0,96	4	3	-
14	0	36,21	4,7	9,41	2,7	2,44	1,46	0,78	0,16	9	7	4,57	1,99	4,52	1,97	4	4	asimétrico
15	0	20,36	4	8,22	2,25	1,99	1,37	0,67	0,12	6	6	3,63	1,47	3,61	1,44	2	2	asimétrico
16	0	27,13	4,66	9,27	2,52	2,26	1,66	0,77	0,17	7	5	3,82	1,37	4,15	1,5	6	6	asimétrico
17	0	37,65	4,76	9,5	2,76	2,5	1,32	0,74	0,21	7	7	4,64	1,78	4,69	2,1	2	2	asimétrico
18	1	5,68	2,88	6,08	1,49	1,23	0,99	0,5	0,11	4	3	1,64	0,75	1,64	0,74	4	4	-
19	1	6,64	3,01	6,35	1,57	1,31	1,04	0,51	0,14	5	6	1,82	0,7	1,82	0,72	2	2	-
20	1	10,37	3,52	7,48	1,83	1,57	1,17	0,72	0,12	7	5	2,26	0,96	-	-	4	4	-
21	0	28,69	4,5	8,88	2,45	2,19	1,35	0,76	0,16	6	6	3,73	1,52	3,9	1,77	2	2	asimétrico
22	0	11,34	3,49	7,33	1,85	1,59	1,2	0,62	0,15	5	6	2,3	0,91	2,34	0,91	3	4	asimétrico
23	0	42,25	4,7	9,22	2,75	2,49	1,4	0,77	0,16	7	6	5,17	2,27	5,13	2,3	4	3	asimétrico
24	1	6,18	2,91	6,24	1,5	1,24	0,97	0,55	0,11	5	5	1,8	0,74	1,71	0,7	2	2	-
25	1	29,5	4,99	10,07	2,74	2,48	1,49	0,87	0,22	8	8	3,32	1,4	3,63	1,24	4	4	-
26	1	20,32	4,26	8,87	2,34	2,08	1,25	0,72	0,19	9	8	2,75	1,27	2,63	1,2	6	6	-
27	1	18,97	4,35	8,93	2,35	2,09	1,38	0,8	0,16	6	6	-	-	2,5	1,1	4	4	-
28	1	9,97	3,3	7,16	1,74	1,48	1,05	0,62	0,11	6	6	2,01	0,9	2,04	0,72	3	3	-
29	1	19,6	4	8,75	2,34	2	1,2	0,72	0,16	6	6	2,64	1,1	2,72	1,2	2	2	-
30	1	20,56	4,31	8,99	2,34	1,88	1,3	0,75	0,2	7	6	2,87	1,15	2,9	1,23	4	4	-
31	1	19,57	4,25	8,9	2,25	1,82	1,42	0,77	0,21	5	5	2,77	1,2	2,78	1,06	4	4	-
32	0	5,02	2,54	5,32	1,38	1,12	0,77	0,46	0,05	5	5	1,76	0,76	1,71	0,72	2	2	asimétrico
33	0	11,05	3,7	7,3	1,97	-	1,04	0,58	0,13	6	5	2,7	1,09	2,47	1,1	4	4	asimétrico
34	1	3,76	2,5	5,43	1,25	0,99	0,87	0,46	0,09	4	4	1,58	0,58	1,54	0,58	3	3	-
35	0	3,6	2,45	4,9	1,2	1,71	0,87	0,42	0,1	4	5	1,54	0,6	1,51	0,62	1	2	asimétrico
36	1	6,98	3,14	6,5	1,53	1,27	1,1	0,54	0,12	-	-	1,88	0,75	-	-	4	5	-
37	0	5,92	2,9	5,83	1,94	1,68	1	0,5	0,11	-	-	-	-	1,85	0,83	3	2	asimétrico
38	0	41,13	4,5	8,49	2,7	2,31	1,07	0,92	-	-	-	5,04	1,97	4,92	2,01	4	4	asimétrico
39	0	3,93	2,46	5,02	1,27	1,01	0,8	0,42	0,13	-	-	1,09	0,46	1,5	0,7	2	2	asimétrico
40	0	13,87	3,55	7,09	1,9	1,53	1,12	0,62	0,16	-	-	2,65	1,67	2,62	1,16	4	5	asimétrico
41	0	23,87	4,13	8,12	2,27	2,01	1,44	0,66	0,15	-	-	3,56	1,57	3,56	1,59	2	3	asimétrico
42	0	5,33	2,67	5,46	1,35	1,01	0,96	0,48	0,1	-	-	1,52	0,63	1,6	0,72	2	2	asimétrico
43	0	5,08	2,75	5,43	1,3	1,04	1	0,5	0,1	-	-	1,7	0,8	1,69	0,75	2	3	asimétrico
44	0	12,5	3,65	7,4	1,83	1,32	1,16	0,58	0,12	-	-	2,5	0,91	2,4	0,99	3	3	asimétrico
45	0	20,11	4,08	8,23	2,16	1,9	1,42	0,7	0,21	-	-	3,09	1,41	3,1	1,37	5	4	asimétrico
46	0	6,73	3,04	6,05	1,5	1,21	1,02	0,5	0,1	-	-	-	-	2,08	0,9	3	2	asimétrico
47	0	8,03	3,08	6,26	1,57	1,31	1,12	0,55	0,13	-	-	2,23	1,02	2,06	0,87	2	3	asimétrico
48	0	5,55	2,8	5,7	1,92	1,66	0,92	0,54	0,12	-	-	-	-	1,91	0,8	4	2	asimétrico

Caracterización morfométrica de *A. pallipes* de la población de R. Nervión (PVS). En la parte superior se indica el código, localidad a la que pertenece y fecha de muestreo de la población.

Río: Astacifactoría Rillo de Gallo Localidad: (Guadalajara)

Código: RIL

Fecha: 03/08/98

Nº	SEXO	PESO (g)	LCF (cm)	LT (cm)	ACF (cm)	LROS (cm)	ABASROS (cm)	AAPROS (cm)	LAP (cm)	IESP3MAX	DESP 3MAX	ILPINZA (cm)	IAPINZA (cm)	DLPINZA (cm)	DAPINZA (cm)	IESP CER	DESP CER	LOB. PLEOP.
1	0	43,94	5,24	9,93	3,85	3,59	1,66	0,89	0,27	9	9	4,96	1,78	5,11	1,75	2	3	asimétrico
2	0	51,9	5,17	9,81	2,93	2,67	1,22	0,78	0,16	8	5	5,56	2,23	5,48	2,24	5	3	asimétrico
3	0	48,59	5,16	9,72	2,86	2,6	1,45	0,85	0,22	6	5	5,31	2,15	5,23	2,12	1	2	asimétrico
4	0	38,47	5,03	9,34	2,84	2,58	1,58	0,81	0,19	6	6	4,89	1,72	4,33	1,37	2	2	asimétrico
5	0	30,16	4,56	8,67	2,54	2,28	1,38	0,72	0,13	6	6	4,79	1,82	4,15	1,81	1	2	asimétrico
6	0	45,64	4,92	10,02	2,78	2,52	1,33	0,82	0,22	7	7	5,12	2,1	5,07	2,12	2	2	asimétrico
7	0	43,8	4,87	9,53	2,72	2,46	1,35	0,79	0,27	7	7	5,1	2,14	5,05	1,92	2	2	asimétrico
8	0	32,8	4,62	9,04	2,52	2,26	1,15	0,71	0,18	4	6	4,11	1,72	5,01	1,96	1	1	asimétrico
9	0	41,58	5,17	10,06	2,84	2,54	1,56	0,85	0,12	7	7	3,88	1,7	4,81	1,76	2	2	asimétrico
10	0	52,67	5,29	10,43	3,01	2,75	1,69	0,81	0,21	6	5	5,45	2,16	5,34	2,1	2	2	asimétrico
11	1	30,07	4,85	10,03	2,76	2,5	1,5	0,85	0,17	7	7	3,11	1,34	3,37	1,42	2	2	
12	0	49,86	5,71	10,01	3,04	2,78	1,3	0,85	0,12	7	7	4,22	1,47	5,98	2,31	2	2	asimétrico
13	0	63,21	5,54	10,83	3,36	3,1	1,6	0,79	0,2	6	7	5,8	2,28	5,77	2,24	3	2	asimétrico
14	1	33,26	4,99	9,9	2,93	2,32	1,32	0,88	0,22	7	6	3,46	1,34	1,87	0,8	2	2	
15	1	31,42	4,82	9,97	2,71	2,45	1,37	0,87	0,22	5	5	3,35	1,89	3,09	1,27	3	3	
16	1	31,15	4,83	10,04	2,65	2,39	1,44	0,8	0,22	7	7	3,59	1,5	3,56	1,5	2	2	
17	1	27,5	4,63	9,49	2,68	2,42	1,43	0,8	0,15	7	5	3,28	1,51	3,41	1,47	3	3	
18	1	26,35	4,53	9,65	2,6	2,34	1,37	0,82	0,21	7	7	3,08	1,37	3,06	1,36	2	2	
19	1	36,54	4,98	10,26	2,82	2,56	1,26	0,76	0,23	7	6	4,07	1,72	4	1,71	3	3	
20	1	28,76	4,78	10,05	2,71	1,45	1,5	0,84	0,15	7	6	3,7	1,54	2,35	0,82	2	3	
21	1	34,04	4,95	10,47	2,85	2,59	1,55	0,77	0,2	6	7	2,15	0,93	3,74	1,72	2	3	
22	1	49,55	5,6	11,32	3,25	2,99	1,78	1,02	0,22	7	7	4,63	1,78	4,45	1,74	1	1	
23	0	46	4,95	9,66	2,76	2,61	1,58	0,83	0,2	8	9	5,38	2,2	5,2	2,18	1	3	asimétrico
24	0	43,69	4,93	10	2,74	1,78	1,57	0,78	0,24	6	7	4,8	2,1	4,94	2,08	3	2	asimétrico
25	1	36,08	5,1	10,02	2,84	2,33	1,6	0,85	0,17	7	7	3,74	1,62	3,73	1,63	2	2	
26	0	47,24	5,24	10,12	2,99	2,73	1,51	0,86	0,33	6	6	5,04	2,05	4,92	2,08	2	2	asimétrico
27	0	41,05	4,87	9,61	2,68	2,02	1,29	0,76	0,17	8	6	4,95	2,01	4,93	2,01	1	1	asimétrico
28	0	34,92	4,8	9,66	2,72	2,21	1,39	0,73	0,18	5	7	4,05	1,74	4,42	1,73	1	1	asimétrico
29	0	36,45	4,57	9,5	2,6	2,03	1,25	0,74	0,19	8	9	4,53	1,91	4,36	1,93	1	1	asimétrico
30	0	40,03	4,97	9,77	2,7	2,44	1,42	0,86	0,17	8	6	5,38	2,15	3,87	1,4	1	2	asimétrico
31	0	33,66	4,5	9,03	2,57	2,31	1,46	0,78	0,12	7	7	4,5	1,7	4,49	1,87	2	3	asimétrico
32	1	24,26	4,6	9,09	2,57	1,3	1,44	0,76	0,18	6	6	falta	falta	2,7	0,93	2	2	
33	1	falta	5,25	10,69	3,06	2,8	1,66	0,9	0,25	5	6	3,98	1,6	4,28	1,65	2	3	
34	0	32,46	4,7	9,45	2,59	2,33	1,36	0,79	0,22	9	3	4,33	1,71	4,15	1,69	1	1	asimétrico
35	1	28,93	4,68	9,17	2,6	1,7	1,41	0,77	0,24	5	5	3,24	1,45	3,3	1,41	1	1	
36	1	22,76	4,42	9,25	2,53	2,27	1,13	0,77	0,19	8	8	2,94	1,1	3,18	1,22	1	1	
37	1	22,36	4,38	9,32	2,37	2,11	1,37	0,81	0,2	7	5	2,99	1,32	2,81	0,96	3	2	
38	1	26,24	5,84	10,04	2,57	2,31	1,85	0,8	0,14	7	7	3,79	1,33	falta	falta	3	4	
39	0	38	4,83	9,71	2,74	2,48	1,2	0,75	0,14	8	8	5,07	1,92	4,9	1,57	3	3	asimétrico
40	0	44,78	5,15	10,2	2,93	2,4	1,31	0,85	0,2	8	12	5,23	2,07	4,78	1,69	3	3	asimétrico
41	0	34,21	5,02	9,59	2,81	2,55	1,48	0,82	0,15	6	9	falta	falta	5,35	2,12	1	2	asimétrico
42	0	44,23	4,88	9,96	2,91	2,65	1,3	0,85	0,17	6	6	4,73	2,04	4,9	2,03	1	1	asimétrico

Caracterización morfométrica de *A. pallipes* de la población de Astacifactoría de Rillo de Gallo (RIL). En la parte superior se indica el código, localidad a la que pertenece y fecha de muestreo de la población.

Río: Río Guadazón

Localidad: Valdemoro (Cuenca)

Código: VII

Fecha: 19/08/98

Nº	SEXO	PESO (g)	LCF (cm)	LT (cm)	ACF (cm)	LROS (cm)	ABASROS (cm)	AAPROS (cm)	LAP (cm)	IESP3MAX	DESP 3MAX	ILPINZA (cm)	IAPINZA (cm)	DLPINZA (cm)	DAPINZA (cm)	IESP CER	DESP CER	LOB. PLEOP.
1	0	20,36	4,17	8,16	2,35	2,09	1,12	0,67	0,18	9	8	3,32	1,27	3,3	1,23	3	3	asimétrico
2	0	19,07	3,92	7,67	2,13	1,87	1,24	0,7	0,14	6	5	3,28	1,36	3,39	1,35	2	2	asimétrico
3	0	24,35	4,43	8,39	2,32	2,06	1,24	0,7	0,16	9	8	2,63	0,86	4,05	1,67	4	5	asimétrico
4	0	20,71	4	8,25	2,25	1,99	1,16	0,63	0,14	6	8	3,41	1,35	3,3	1,31	4	4	asimétrico
5	1	18,97	4,16	8,17	2,27	2,01	1,29	0,72	0,19	5	5	2,75	1	2,9	1,16	3	3	
6	0	23,12	4,21	8,41	2,36	2,1	1,29	0,71	0,13	6	7	3,64	1,49	3,62	1,56	3	3	asimétrico
7	0	27,41	4,37	8,67	2,34	2,08	1,36	0,75	0,18	7	7	3,76	1,64	3,8	1,64	3	3	asimétrico
8	0	23,98	4,42	8,19	2,31	2,05	1,36	0,66	0,18	9	8	3,42	1,22	3,75	1,57	3	3	asimétrico
9	0	16,91	3,8	7,08	2,04	1,78	1,2	0,65	0,16	6	6	2,92	1,34	2,92	1,35	4	4	asimétrico
10	0	19,35	3,89	7,8	2,2	1,94	1,32	0,68	0,13	7	7	3,22	1,41	3,42	1,38	5	4	asimétrico
11	0	32,92	4,67	9,51	2,55	2,29	1,26	0,69	0,19	8	7	3,69	1,27	4,38	1,75	2	2	asimétrico
12	0	20,59	4,03	8,12	2,16	1,9	1,27	0,57	0,18	6	5	3,44	1,52	3,56	1,51	3	3	asimétrico
13	0	15,35	3,66	7,41	2,03	1,77	1	0,57	0,12	3	4	2,6	1	3	1,36	2	2	asimétrico
14	0	11,12	3,46	6,95	1,83	1,57	0,97	0,61	0,1	5	6	2,01	0,84	2,07	0,87	2	2	asimétrico
15	0	8,05	3,02	6,31	1,57	1,31	1,09	0,52	0,1	4	4	1,93	0,82	1,96	0,85	2	2	asimétrico
16	0	9,05	3,13	6,45	1,66	1,4	1	0,56	0,11	5	3	2,14	0,95	2,08	0,87	1	2	asimétrico
17	0	7,87	3,15	6,14	1,69	1,43	0,9	0,49	0,09	falta	falta	1,9	0,92	1,9	0,9	2	2	falta
18	1	9,23	3,19	6,84	1,76	1,5	0,83	0,6	0,12	5	4	1,49	0,7	2	0,95	3	3	
19	1	19,49	4,12	9,75	2,3	2,04	1,16	0,7	0,22	2	6	2,71	1,16	2,64	1,17	1	2	
20	1	4,75	2,56	5,56	1,34	1,08	0,76	0,47	0,1	5	3	1,5	0,65	1,46	0,62	2	4	
21	1	33,91	5,05	10,57	2,8	2,54	1,54	0,82	0,2	8	6	3,77	1,59	3,82	1,59	5	3	
22	1	11,89	3,63	6,96	1,82	1,56	1,13	0,61	0,14	5	3	2,24	0,92	1,86	0,6	1	1	
23	1	13,99	3,76	7,76	2	1,74	1,07	0,6	0,14	5	4	2	1	2,2	0,91	3	3	
24	1	15	3,85	7,82	2,06	1,8	1,19	0,66	0,13	7	6	2,5	1,08	1,8	0,67	4	4	
25	1	10,88	3,56	7,4	1,88	1,42	1	0,62	0,15	5	5	1,21	0,46	2,18	0,88	4	3	
26	1	5,2	2,75	5,75	1,4	1,14	0,95	0,43	0,12	5	4	1,36	0,5	1,47	0,65	3	3	
27	1	12,09	3,5	7,2	1,87	1,61	0,19	0,6	0,11	3	4	2,23	0,97	2,12	0,82	3	4	
28	1	6,42	2,88	6,16	1,51	1,25	0,94	0,52	0,1	3	4	1,6	0,7	1,72	0,72	3	3	
29	1	25,63	4,54	9,45	2,51	2,25	1,32	0,74	0,2	6	7	2,9	1,17	3,18	1,37	2	2	
30	1	18,25	3,94	8,4	2,22	1,96	1,2	0,61	0,17	5	6	2,71	1,17	2,71	1,15	4	4	
31	1	7,08	3,01	6,21	1,56	1,3	1,01	0,52	0,1	5	4	1,54	0,71	1,55	0,71	3	4	
32	1	5,74	2,73	5,7	1,46	1,2	0,84	0,52	0,12	2	3	1,39	0,61	1,4	0,52	3	3	
33	1	5,83	2,8	5,71	1,45	1,19	1,01	0,47	0,11	4	4	1,6	0,69	1,59	0,67	1	1	
34	0	7,53	3,17	6,01	1,6	1,34	1	0,57	0,13	5	3	1,43	0,62	1,77	0,75	3	3	asimétrico
35	1	12,25	3,78	7,64	1,91	1,65	1,11	0,58	0,11	5	4	1,97	0,72	2,12	0,75	3	4	

Caracterización morfométrica de *A. pallipes* de la población de R. Guadazón (VII). En la parte superior se indica el código, localidad a la que pertenece y fecha de muestreo de la población.